

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10113187 A**

(43) Date of publication of application: **06 . 05 . 98**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 38/45
A61K 38/45
A61K 38/45
A61K 38/45
A61K 45/00
A61K 48/00
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 9/12
C12Q 1/48
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566
/(C12N 9/12 , C12R 1:91)

(21) Application number: **09127990**

(22) Date of filing: **01 . 05 . 97**

(30) Priority: **20 . 11 . 95 JP 07325129**
 05 . 01 . 96 JP 08 17150
 26 . 04 . 96 JP 08131206
 24 . 07 . 96 JP 08213243
 23 . 08 . 96 JP 08241061

(62) Division of application: **08324594**

(71) Applicant: **KIRIN BREWERY CO LTD**

(72) Inventor: **KAIBUCHI KOZO**
IWAMATSU AKIHIKO
NAKANO TAKESHI
ITO MASAOKI
TAKAHASHI NOBUAKI
KOBAYASHI MAKOTO

(54) **RHO-TARGETING PROTEIN OF RHO KINASE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new protein comprising a material having activated type of Rho protein-bonding ability and protein kinase activities, and useful as an inhibitor against tumorigenesis and metastasis, an inhibitor against smooth muscle shrinkage, a treating agent for circulatory system disease, a platelet aggregation inhibitor, etc.

SOLUTION: This new protein is the protein having an amino acid sequence of the formula, a bonding ability to an activated type Rho protein and protein kinase activities, or its derivative, and useful as an

inhibitor against tumorigenesis and metastasis, an inhibitor against smooth muscle shrinkage, a platelet aggregation inhibitor, a therapeutic agent for inflammatory disease or autoimmune disease, etc. The protein is obtained by synthesizing cDNA by using human brain mRNA as a replica, performing a PCR by using a primer synthesized based on a base sequence of cDNA of bovine Rho kinase to obtain a partial fragment of human Rho kinase cDNA, screening human cerebral cDNA library by using the partial fragment of the human Rho kinase cDNA as a probe to obtain a gene, and incorporating the gene into a vector to express the gene in the host cell.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-113187

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月6日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 38/45

識別記号

Z N A
A B U
A B X
A C B
A D U

F I

C 1 2 N 15/00
A 6 1 K 45/00
48/00
C 1 2 N 1/19
1/21

Z N A A
A B E
A B R

審査請求 未請求 請求項の数82 F D (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-127990
(62) 分割の表示 特願平8-324594の分割
(22) 出願日 平成8年(1996)11月20日

(31) 優先権主張番号 特願平7-325129
(32) 優先日 平7(1995)11月20日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平8-17150
(32) 優先日 平8(1996)1月5日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平8-131206
(32) 優先日 平8(1996)4月26日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年7月25日

(71) 出願人 000253503
麒麟麦酒株式会社
東京都中央区新川二丁目10番1号
(72) 発明者 貝 淵 弘 三
奈良県生駒市北大和2-22-24
(72) 発明者 岩 松 明 彦
神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟
麦酒株式会社基盤技術研究所内
(72) 発明者 中 野 赳
三重県津市長岡町3002-2
(72) 発明者 伊 藤 正 明
三重県津市波見町722-28
(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外3名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R h o 標的タンパク質 R h o キナーゼ

(57) 【要約】

【課題】 活性型 R h o タンパク質の標的タンパク質の提供。

【解決手段】 活性型 R h o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質またはその誘導体 (R h o キナーゼ) である。ウシ由来のタンパク質の分子量は、S D S - P A G E による測定で約 1 6 4 k D a である。活性型 R h o タンパク質と結合すると、そのプロテインキナーゼ活性が亢進される。R h o キナーゼの改変タンパク質もまた開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質またはその誘導体。

【請求項2】 活性型R h oタンパク質との結合によってそのプロテインキナーゼ活性が亢進される、請求項1に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項3】 プロテインキナーゼがセリン／スレオニン・プロテインキナーゼである、請求項1または2に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項4】 ウシ由来である、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項5】 分子量がSDS-PAGEによる測定で約164kDaである、請求項4に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項6】 配列番号1のアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項7】 配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項6に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項8】 配列番号1の1～89番のアミノ酸配列またはその部分配列、および／または360～942番のアミノ酸配列またはその部分配列、および／または1069～1388番のアミノ酸配列またはその部分配列が欠失された、請求項7に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項9】 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項10】 配列番号1の90～359番のアミノ酸配列と943～1068番のアミノ酸配列とを有するタンパク質またはその誘導体。

【請求項11】 ヒト由来である、請求項1～3いずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項12】 配列番号4のアミノ酸配列からなる、請求項1～3、および11のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項13】 配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項12に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項14】 配列番号4の1～89番のアミノ酸配列またはその部分配列、および／または360～942番のアミノ酸配列またはその部分配列、および／または1069～1388番のアミノ酸配列またはその部分配列が欠失された、請求項13に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項15】 配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項16】 配列番号4の90～359番のアミノ酸配列と943～1068番のアミノ酸配列とを有するタンパク質またはその誘導体。

【請求項17】 活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないタンパク質またはその誘導体。

10 【請求項18】 配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項17に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項19】 配列番号1の90～359番のアミノ酸配列またはプロテインキナーゼ活性を有するその一部を含む領域が欠失された、請求項18に記載のタンパク質またはその誘導体。

20 【請求項20】 配列番号1の121番目のL y sがG l yで置換された請求項18に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項21】 配列番号1の421～1137番、438～1124番、799～1137番、943～1068番、または941～1075番のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

30 【請求項22】 配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項17に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項23】 配列番号4の90～359番のアミノ酸配列またはプロテインキナーゼ活性を有するその一部を含む領域が欠失された、請求項22に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項24】 配列番号4の121番目のL y sがG l yで置換された、請求項22に記載のタンパク質またはその誘導体。

40 【請求項25】 配列番号4の943～1068番のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項26】 配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつ活性型R h oタンパク質および／またはR h oキナーゼの機能を阻害する、タンパク質およびその誘導体。

50 【請求項27】 前記配列番号1のアミノ酸配列が、配列番号1の941～1075番または943～1068番のアミノ酸配列である、請求項26に記載のタンパク質

およびその誘導体。

【請求項28】前記配列番号1のアミノ酸配列が、配列番号1の1125～1388番のアミノ酸配列である、請求項26に記載のタンパク質およびその誘導体。

【請求項29】前記配列番号1のアミノ酸配列が、121番のLysがGlyによって置換された、配列番号1の6～553番のアミノ酸配列からなる、請求項26に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項30】配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつ活性型Rhoタンパク質および／またはRhoキナーゼの機能を阻害する、タンパク質およびその誘導体。

【請求項31】前記配列番号4のアミノ酸配列が、配列番号4の941～1075番または943～1068番のアミノ酸配列である、請求項30に記載のタンパク質およびその誘導体。

【請求項32】前記配列番号4のアミノ酸配列が、配列番号4の1125～1388番のアミノ酸配列である、請求項30に記載のタンパク質およびその誘導体。

【請求項33】前記配列番号4のアミノ酸配列が、121番のLysがGlyによって置換された、配列番号4の6～553番のアミノ酸配列からなる、請求項30に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項34】プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型Rhoタンパク質結合能を有さないタンパク質またはその誘導体。

【請求項35】配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項34に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項36】配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつキナーゼ活性が構成的に活性化された、タンパク質およびその誘導体。

【請求項37】配列番号1の943～1068番のアミノ酸配列または活性型Rhoタンパク質結合能を有するその一部を含む領域が欠失された、請求項34～36のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項38】配列番号1の90～359番または6～553番のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項39】配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が

付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失された、請求項34に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項40】配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつキナーゼ活性が構成的に活性化された、タンパク質およびその誘導体。

【請求項41】配列番号4の943～1068番のアミノ酸配列または活性型Rhoタンパク質結合能を有するその一部を含む領域が欠失された、請求項34、39および40のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項42】配列番号4の90～359番または6～553番のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項43】請求項1～16および34～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体をコードする塩基配列。

【請求項44】請求項17～25のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体をコードする塩基配列。

【請求項45】請求項26～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体をコードする塩基配列。

【請求項46】配列番号2のDNA配列の一部または全部を有する、請求項43～45のいずれか一項に記載の塩基配列。

【請求項47】塩基配列の一部が、配列番号2の268～1077番、16～1659番、1261～3411番、2395～3411番、1312～3372番、2827～3204番、2821～3225番、または3373～4164番のDNA配列である、請求項46に記載の塩基配列。

【請求項48】配列番号5のDNA配列の一部または全部を有する、請求項43～45のいずれか一項に記載の塩基配列。

【請求項49】塩基配列の一部が、配列番号5の268～1077番、2827～3204番、2821～3225番、または3373～4164番のDNA配列である、請求項48に記載の塩基配列。

【請求項50】請求項43～49のいずれか一項に記載の塩基配列を含んでなる、ベクター。

【請求項51】請求項44または45に記載の塩基配列を含んでなる、ベクター。

【請求項52】プラスミドベクター、ウイルスベクター、およびリポソームベクターからなる群から選択される、請求項50または51に記載のベクター。

【請求項53】請求項50～52のいずれか一項に記載のベクターによって形質転換された、宿主細胞（た

し、ヒト細胞にあつてはヒトから単離された細胞に限る)。

【請求項54】大腸菌、酵母、昆虫細胞、Sf9細胞、COS細胞、リンパ細胞、繊維芽細胞、CHO細胞、血液系細胞、および腫瘍細胞からなる群から選択されるものである、請求項53に記載の宿主細胞。

【請求項55】請求項53または54に記載の宿主細胞を培養し、そしてその培養物から請求項1～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはそれらの誘導体を単離することを含む、請求項1～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはそれらの誘導体の製造法。

【請求項56】(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型Rhoタンパク質と、請求項1～25のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)活性型Rhoタンパク質と、請求項1～25のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体との結合の阻害の程度を測定することを含む、活性型Rhoタンパク質と、請求項1～25のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体との結合を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項57】スクリーニング系が細胞系または無細胞系である、請求項56に記載のスクリーニング法。

【請求項58】スクリーニング系が酵母ツー・ハイブリッド・システムである、請求項56または57に記載のスクリーニング法。

【請求項59】(1)スクリーニングの対象となる物質を、請求項1～16および34～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)請求項1～16および34～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性の阻害の程度を測定することを含む、請求項1～16および34～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項60】(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型Rhoタンパク質と、請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性またはその活性の亢進の阻害の程度を測定することを含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性またはその活性の亢進を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項61】スクリーニング系に存在させる活性型Rhoタンパク質が、翻訳後修飾されたタンパク質である、請求項60に記載のスクリーニング法。

【請求項62】プロテインキナーゼの活性または活性の亢進の阻害の程度を、ミエリン塩基性タンパク質、S6

ペプチド、αPKC、ビンキュリン、タリン、メタビンキュリン、カルデスモン、フィラミン、ビメンチン、α-アクチニン、MAP-4、ミオシン軽鎖、ミオシン軽鎖フォスファターゼ、およびミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットからなる群から選択される基質を用いて測定する、請求項59～61のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項63】スクリーニング系が細胞系または無細胞系である、請求項59～62のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項64】(1)スクリーニングの対象となる物質を、請求項34～42のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体を存在させることによってストレスファイバーまたはフォーカル接着の形成が誘導された細胞系に存在させ、そして(2)前記細胞系のストレスファイバーまたはフォーカル接着の形成の阻害の程度を測定することを含む、ストレスファイバーまたはフォーカル接着の形成を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項65】腫瘍形成または転移抑制物質のスクリーニング法である、請求項56～64のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項66】平滑筋収縮抑制物質のスクリーニング法である、請求項56～64のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項67】血小板または白血球の凝集または活性化を抑制する物質のスクリーニング法である、請求項56～64のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項68】配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項69】請求項68に記載されるペプチドに対する、抗体。

【請求項70】ポリクローナル抗体である、請求項69に記載の抗体。

【請求項71】請求項69または70に記載の抗体によって認識される、タンパク質。

【請求項72】請求項69または70に記載の抗体によって認識される、請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項73】(1)検出の対象となる物質を請求項69または70に記載の抗体を含む検出系に存在させ、そして(2)検出の対象となる物質と請求項69または70に記載の抗体との反応の程度を測定することを含む、前記抗体と特異的に反応する物質の検出法。

【請求項74】請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質が関与する疾患の検出法である、請求項73に記載の検出法。

【請求項75】請求項69または70に記載の抗体を含む、前記抗体によって認識される物質の検出キット。

【請求項76】請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質が関与する疾患の検出キットである、請求項

10

20

30

40

50

75に記載の検出キット。

【請求項77】請求項17～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体、あるいは請求項44または45に記載の塩基配列または請求項51に記載のベクターを含む、平滑筋収縮抑制剤。

【請求項78】請求項17～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体、あるいは請求項44または45に記載の塩基配列または請求項51に記載のベクターを含む、循環器系疾患治療剤。

【請求項79】循環器系疾患が、高血圧症、血管攣縮（心血管攣縮および脳血管攣縮）、狭心症、心筋梗塞および閉塞性動脈硬化症から選択される、請求項78に記載の治療剤。

【請求項80】請求項17～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体、あるいは請求項44または45に記載の塩基配列または請求項51に記載のベクターを含む、腫瘍形成または転移抑制剤。

【請求項81】請求項17～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体、あるいは請求項44または45に記載の塩基配列または請求項51に記載のベクターを含む、炎症性疾患または自己免疫疾患治療剤。

【請求項82】請求項17～33のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体、あるいは請求項44または45に記載の塩基配列または請求項51に記載のベクターを含む、血小板凝集阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、活性型Rhoタンパク質結合能を有する新規なタンパク質に関する。

【0002】背景技術

生体内には、サブユニット構造を有さない分子量2～3万の一群の低分子量GTP結合タンパク質（Gタンパク質）が存在している。現在、低分子量Gタンパク質のスーパーファミリーには酵母から哺乳動物に至るまですでに50種類以上のメンバーが見出されている。低分子量Gタンパク質は、アミノ酸配列の類似性からRas、Rho、Rab、その他の4つのファミリーに大別することができる。この低分子量Gタンパク質は種々の細胞機能を制御していることが明らかになってきており、例えば、Rasタンパク質は細胞の増殖や分化等を、Rhoタンパク質は細胞の形態変化や細胞接着、細胞運動等をそれぞれ制御していると考えられている。

【0003】このうちRhoタンパク質は、GDP/GTP結合能および内在性GTPase活性を示し、リゾホスファチジン酸（LPA）およびある種の成長因子等のような細胞外シグナルに対する細胞骨格応答に関係していると考えられている。不活性型であるGDP結合Rhoタンパク質にある刺激が与えられると、Smg GD

S、DblやOstのようなGDP/GTP変換タンパク質の働きによって活性型であるGTP結合Rhoタンパク質（以下、「活性型Rhoタンパク質」という）に変換される。そして、この活性型Rhoタンパク質が標的タンパク質に作用することによってストレス繊維および接着斑が形成され、細胞接着および細胞運動等が誘導されると考えられている（実験医学 vol. 12, No. 8, 97-102(1994)、Takai, Y. et al. Trends Biochem. Sci., 20, 227-231 (1995)）。一方、Rhoタンパク質内在性GTPaseにより活性型Rhoタンパク質はGDP結合Rhoタンパク質に変換される。この内在性GTPaseの活性を亢進するタンパク質はGTPase活性化タンパク質（GAP）（Lamarche, N. & Hall, A. et al., TIG, 10, 436-440 (1994)）と呼ばれている。

【0004】天然のRhoAタンパク質のC末端にはCys-A-A-Leu（Aは脂肪族アミノ酸）構造が存在し、Cys残基にグラニルグラニル基転移酵素の働きによりグラニルグラニル基が結合し、さらにCys残基のカルボキシル基がメチル化される。この脂質による翻訳後修飾は、Rhoタンパク質の細胞膜への結合や活性制御タンパク質との相互作用に必要であるとともに、その機能の発現にも必要であると考えられている（Imazumi, K. et al., 実験医学 13, 646-656 (1995)）。

【0005】RhoAタンパク質、RhoBタンパク質、RhoCタンパク質、Rac1タンパク質、Rac2タンパク質、Cdc42タンパク質のようなRhoファミリーのタンパク質のアミノ酸配列は、お互いに50%以上の類似性がある。このRhoファミリーのタンパク質は、リゾホスファチジン酸（LPA）や増殖因子のような細胞外シグナルに応答して、ストレスファイバー（stress fiber）やフォーカル接着（focal adhesion）の形成を引き起こす反応に関与していると考えられている（A. J. Ridley & A. Hall, Cell, 70, 389-399 (1992), A. J. Ridley & A. Hall, EMBO J., 13, 2600-2610 (1994)）。また、サブファミリーであるRhoタンパク質は、細胞の形態変化（H. F. Parterson et al., J. Cell Biol., 111, 1001-1007 (1990)）、細胞接着（Morii, N. et al., J. Biol. Chem. 267, 20921-20926 (1992)、T. Tominaga et al., J. Cell Biol., 120, 1529-1537 (1993)、Nusrat, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10629-10633 (1995)*、Landanna, C. et al., Science 271, 981-983 (1996)*）、細胞運動（K. Takaishi et al., Oncogene, 9, 273-279 (1994)）、細胞質分裂（cytokinesis）（K. Kishi et al., J. Cell Biol., 120, 1187-1195 (1993)、I. Mabuchi et al., Zygote, 1, 325-331 (1993)）のような細胞骨格の再編成をもなった生理機能にも関連があると考えられている。更に、Rhoタンパク質は、平滑筋収縮（K. Hirata et al., J. Biol. Chem., 267, 8719-8722 (1992)、M. Noda et al., FEBS Lett., 367, 246-250 (1995)、M. Gong et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1340~1345 (1996) *)、フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI 3-キナーゼ) (J. Zhang et al., J. Biol. Chem., 268, 22251-22254 (1993))、フォスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PI 4, 5-キナーゼ) (L. D. Chong et al., Cell, 79, 507-513 (1994)) や c-fos の発現 (C. S. Hill et al., Cell, 81, 1159-1170 (1995)) の制御にも関与していることが示唆されている。

【0006】また、最近では、アミノ酸配列を一部置換した Rho タンパク質が細胞内に導入されると Ras 依存的な腫瘍形成が抑制されること等が見出され、Rho タンパク質が Ras による細胞の形質転換、すなわち腫瘍形成、において重要な役割を果たしていることが明らかにされている (G. C. Prendergast et al., Oncogene, 10, 2289-2296 (1995)、Khosravi-Far, R., et al., Mol. Cell Biol., 15, 6443-6453 (1995) *)、R. Qiu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11781-11785 (1995) *)、および Lebowitz, P. et al., Mol. Cell Biol., 15, 6613-6622 (1995) *)。

【0007】更に、Rho タンパク質は細胞増殖、細胞運動、細胞凝集ばかりでなく、平滑筋の収縮をも亢進することが明らかとなってきた。最近の研究によれば、Rho タンパク質は平滑筋収縮に関与することが知られている (K. Hirata et al., J. Biol. Chem. 267, 8719-8722 (1992) および Noda, M. et al., FEBS Lett., 367, 246-250 (1995))。従って、活性型 Rho タンパク質結合タンパク質もまた、平滑筋収縮に関与する可能性が高いと考えられる。

【0008】ミオシン軽鎖リン酸化は、平滑筋収縮 (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603 (1985)、Hartshorne, D. J., & Johnson, D. R., (1987) in Physiology of the Gastrointestinal Tract, (Johnson, L. R., ed) pp. 423-482, Raven Press, New York、および Sellers, J. R. & Adelstein, R. S. in The Enzyme (Boyer, P., and Erevs, E. G., eds) Vol. 18, pp. 381-418, Academic Press, San Diego, CA (1987))、非筋細胞において起こるストレスファイバー形成のためのアクチン-ミオシンの相互作用 (Huttenlocher, A. et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7, 697-706 (1995)) において重要な役割を果たす。これは、また、細胞質分裂および細胞運動に対する作用を有する (Huttenlocher, A. et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7, 697-706 (1995))。

【0009】ミオシン軽鎖キナーゼはミオシン軽鎖の Ser-19 を主として (primarily) リン酸化する (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603 (1985)、Hartshorne, D. J. & Johnson, D. R., (1987) in Physiology of the Gastrointestinal Tract, (Johnson, L. R., ed) pp. 423-482, R

aven Press, New York、Sellers, J. R. & Adelstein, R. S. in The Enzyme (Boyer, P., and Erevs, E. G., eds) Vol. 18, pp. 381-418, Academic Press, San Diego, CA (1987)、および Ikebe, M. & Hartshorne, D. J. J. Biol. Chem. 260, 10027-10031 (1985))。ミオシン軽鎖キナーゼのような特異的なキナーゼの外に、これまで得られたいずれのプロテインキナーゼもこの部位をリン酸化しない (Tan, J. L. et al., Annu. Rev. Biochem. 61, 721-759 (1992))。

【0010】平滑筋を、血管収縮物質のようなアゴニストで刺激すると、 Ca^{2+} は細胞質中へ移動する。 Ca^{2+} はカルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼを活性化する。ミオシン軽鎖のリン酸化によりミオシン-アクチンの相互作用が誘導され、これによりミオシン ATPアーゼが活性化され (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603 (1985)、Hartshorne, D. J., & Johnson, D. R., (1987) in Physiology of the Gastrointestinal Tract, (Johnson, L. R., ed) pp. 423-482, Raven Press, New York、および Sellers, J. R. & Adelstein, R. S. in The Enzyme (Boyer, P., and Erevs, E. G., eds) Vol. 18, pp. 381-418, Academic Press, San Diego, CA (1987))、次いでこれにより平滑筋の収縮が誘導される (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603 (1985)、Hartshorne, D. J., & Johnson, D. R., (1987) in Physiology of the Gastrointestinal Tract, (Johnson, L. R., ed) pp. 423-482, Raven Press, New York、および Sellers, J. R. & Adelstein, R. S. in The Enzyme (Boyer, P. & Erevs, E. G., eds) Vol. 18, pp. 381-418, Academic Press, San Diego, CA (1987))。しかしながら、サイトゾルの Ca^{2+} レベルは常に収縮レベルに比例するわけではなく、平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性を調節しているこれ以外のメカニズムが提案された (Bradley, A. B. & Morgan, K. G., J. Physiol. 385, 437-448 (1987))。GTP γ S (非加水分解性 GTP 類似体) は透過性 (スキンド) 平滑筋の収縮に必要な Ca^{2+} 濃度を低下させるので、GTP 結合タンパク質は Ca^{2+} 感受性を調節すると推定された (Kitazawa, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 9307-9310 (1991)、Moreland, S. et al., Am. J. Physiol. 263, 540-544 (1992))。Rho タンパク質は GTP によって増強される平滑筋の Ca^{2+} 感受性に関係することが示された (Hirata, K. et al., J. Biol. Chem. 267, 8719-8722 (1992))。最近、透過性を高めた平滑筋細胞において、submaximal な Ca^{2+} 濃度で、GTP γ S が、ミオシン軽鎖のリン酸化を促進させることが示され、このミオシン軽鎖のリン酸化の促進は Rho タンパク質の活性化およびミオシン軽鎖の脱リン酸化を担うミオシン軽鎖ホスファターゼの酵素活性の抑制によることが示唆された (Noda, M. et al., FEBS Lett. 367,

246-250 (1995))。しかしながら、R h oタンパク質がいかなる機構でミオシン軽鎖ホスファターゼを抑制するのか、R h oタンパク質によるミオシン軽鎖のリン酸化の増加がミオシン軽鎖ホスファターゼ活性の抑制だけによるものなのかどうか、については依然説明されていない。従って、R h oタンパク質がいかなる機構で平滑筋のCa²⁺感受性を調節し、その結果平滑筋の収縮が增强するのかについては依然説明されていない。

【0011】以上のように、R h oタンパク質は、細胞の形態変化、細胞接着、細胞運動、細胞質分裂、腫瘍の形成や転移、血管平滑筋の収縮等の多数のシグナル伝達経路を調節していることがわかってきた。このことより、R h oタンパク質には多数の標的分子があり、上記の多数のシグナル伝達経路を調節していると考えられている。

【0012】ごく最近（本願の優先権主張の基礎となる最初の出願の後において）、哺乳類において、いくつかの候補タンパク質が報告された。これらのタンパク質は、プロテインキナーゼN (PKN) (Watanabe, G. et al., Science 271, 645-648(1996)*; Amano, M. et al., Science 271, 648-650 (1996)*)、ローフィリン (Watanabe, G. et al., Science 271, 645-648 (1996)*)、シトロン (Madaule, P. et al., FEBS Lett. 377, 243-248 (1995)*)、ROK α (Leung, T. et al., J. Biol. Chem. 270, 29051-29054 (1995)*)、p16^{ROCK} (Ishizaki, T., et al., EMBO J., 15, 1885-1893 (1996)*)、ローテキン (Reid, T. et al., J. Biol. Chem., 271, 13556-13560(1996)*)である。これらのタンパク質はいずれもGTP結合R h oAタンパク質に結合する（ただし、シトロンだけはGTP結合R a c 1タンパク質にも結合する）。

【0013】これらの内、PKNはプロテインキナーゼCのプロテインキナーゼ触媒領域と高い相同性を有する触媒領域を有しており、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ活性を示す (Mukai, H. & Ono, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 897-904 (1994); Mukai, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 348-356 (1994))。一方、ROK α (前掲 Leung, T. et al. (1995)) およびp16^{ROCK} (Ishizaki, T., et al., EMBO J., 15, 1885-1893 (1996)*) もセリン/スレオニン・プロテインキナーゼ触媒領域様のアミノ酸配列を有する (前掲Leung, T. et al. (1995)*)。

【0014】一方、上記の哺乳類タンパク質に加えて、最近、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、哺乳類のR h oAに相当するR h o1タンパク質の標的タンパク質として、プロテインキナーゼC1 (PKC1) が同定された (Nonaka, H. et al., EMBO J. 14, 5931-5938 (1995)*)。更にごく最近、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のR h o1pタンパク質の標的タンパク質として、1, 3- β -グルカン合成酵素が同定された (Drigo

nova, J. et al., Science 272, 277-279(1996) *および Qadota, H. et al., Science 272, 279-281(1996)*)。

【0015】さらに、ごく最近、酵母のR h o1p標的タンパク質として、新規のタンパク質BEM4が同定された (Mack, D. et al., Mol. Cell. Biol., 16, 4387-4395(1996)*)、Hirano, H. et al., Mol. Cell. Biol., 16, 4396-4403 (1996)*)。

【0016】しかしながら、活性型R h oタンパク質が関与する細胞情報伝達機構、特に腫瘍形成や平滑筋収縮に関する機構、は依然として説明されていない。

【0017】なお、本願の優先権主張の基礎となる最初の出願の後に発行された刊行物に*印を付した。

【0018】

【発明の概要】今般、本発明者らは、活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質をウシ脳灰白質から単離した。このタンパク質の分子量は、SDS-PAGEによる測定で約164kDaであった。また、本発明者らは、このタンパク質 (R h oキナーゼ) が活性型R h oタンパク質のエフェクター領域に結合すること、R h oキナーゼがキナーゼ活性を示し、そのキナーゼ活性はGTP γ S・R h oタンパク質により亢進されること、R h oキナーゼがその中間部分にコイルドコイル領域を有すること等を見出した。すなわち、R h oキナーゼはR h oタンパク質の標的となるセリン/スレオニン・キナーゼであり、R h oタンパク質依存的なシグナル伝達経路のメディエーターであることが判明した。また、本発明者らは、R h oキナーゼがミオシン軽鎖ホスファターゼのミオシン結合サブユニットおよびミオシンをリン酸化することおよび血管平滑筋を収縮させることを見出した。

【0019】更に、本発明者らは、ヒトR h oキナーゼのcDNAのクローニングに成功した。本発明者らは、更にまた、培養細胞中へのドミナントアクティブーR h oキナーゼのマイクロインジェクションにより、ストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成が誘導され、ドミナントネガティブーR h oキナーゼのマイクロインジェクションによりLPAまたはR h oタンパク質により誘導されたストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成が阻害されること、そしてスタウロsporinによって、インビトロでR h oキナーゼ活性が阻害されたばかりでなく、R h oキナーゼによって細胞に誘導されるストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成も阻害されることを見出した。本発明は以上の知見に基づくものである。

【0020】即ち、本発明は、活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質 (以下、「R h oキナーゼ」という) の提供をその目的とする。

【0021】また、本発明は、該タンパク質の部分タン

パク質、部分タンパク質を含む該タンパク質をコードする塩基配列、該塩基配列を含んでなるベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞、該タンパク質等の製造法、該タンパク質等を含む腫瘍形成または転移抑制剤、平滑筋収縮抑制剤、血小板凝集阻害剤、および炎症性疾患または自己免疫疾患治療剤、活性型Rhオタンパク質と該タンパク質等との結合を阻害する物質等のスクリーニング法、該タンパク質等のプロテインキナーゼ活性を阻害する物質等のスクリーニング法、ストレスファイバーまたはフォーカル接着を阻害する物質のスクリーニング法、Rhオキナーゼの部分アミノ酸配列、該アミノ酸配列等と特異的に反応する抗体、並びに該抗体を用いた検出法および検出キットの提供をその目的とする。

【0022】

【発明の具体的説明】

定義

本発明において、「アミノ酸」とは、光学異性体、すなわちL体およびD体、のいずれをも含む意味で用いられるものとする。従って、本発明において「ペプチド」とは、L体のアミノ酸のみによって構成されているペプチドだけでなく、D体のアミノ酸を一部または全部含むペプチドをも意味するものとする。

【0023】また、本発明において、「アミノ酸」とは、天然のタンパク質を構成する20種の α -アミノ酸のみならず、それら以外の α -アミノ酸、並びに β -、 γ -、 δ -アミノ酸および非天然のアミノ酸等を含む意味で用いられるものとする。従って、下記のようにペプチドにおいて置換されるかまたはペプチド中に挿入されるアミノ酸としては、天然のタンパク質を構成する20種の α -アミノ酸だけに限定されることはなく、それら以外の α -アミノ酸並びに β -、 γ -、 δ -アミノ酸および非天然のアミノ酸等であってもよい。このような β -、 γ -または δ -アミノ酸としては、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸あるいはオルニチンが挙げられ、また天然タンパク質を構成するもの以外のアミノ酸あるいは非天然のアミノ酸としては、3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸あるいはニペコチン酸等が挙げられる。

【0024】また、本明細書において「本発明によるタンパク質」というときは、その誘導体を含む意味で用いられる。

【0025】更にまた、本明細書において「塩基配列」とは、DNA配列およびRNA配列のいずれをも意味する。

【0026】本明細書において、特定の変異を表す場合には、本来のアミノ酸が最初に、位置番号が二番目に、そして置換アミノ酸が三番目に示される。例えば「Lys121Gly」は、121番目のアミノ酸残基である

Lys (K:リジン) がGly (G:グリシン) で置換されていることを示す。

【0027】タンパク質

本発明によるタンパク質は、活性型Rhオタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質 (Rhオキナーゼ) またはその誘導体である。ここで、Rhオタンパク質としては、RhOAタンパク質、RhOBタンパク質、RhOCタンパク質、またはRhOGタンパク質が挙げられる。

10 【0028】本発明において、「活性型Rhオタンパク質結合能を有するタンパク質」とは、当業者により活性型Rhオタンパク質との結合が認められたと評価されるタンパク質をいい、例えば、実施例1、4、11または13と同様の条件において実験した場合に活性型Rhオタンパク質との結合が認められたと評価されるタンパク質を意味するものとする。

20 【0029】本明細書においてRhオタンパク質は、Rhオタンパク質と本発明によるタンパク質との結合が実質的に損われないように改変されたRhオタンパク質をも含むものとする。このような改変Rhオタンパク質としては、14番目のアミノ酸をバリンで置換したRhOA変異体 (RhOA^{Val}) が挙げられる。

【0030】本発明において、「プロテインキナーゼ活性を有するタンパク質」とは、当業者によりプロテインキナーゼ活性が認められたと評価されるタンパク質をいい、例えば、実施例2、5、6~9または13と同様の条件において実験した場合にプロテインキナーゼ活性が認められたと評価されるタンパク質を意味するものとする。

30 【0031】本発明によるタンパク質は、活性型Rhオタンパク質と結合することによってそのプロテインキナーゼ活性が亢進されるとの性質を有する。ここで「プロテインキナーゼ活性」とは、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ活性を含む意味で用いられる。

【0032】本発明によるタンパク質の起源は特に限定されず、ウシおよびヒトを含む哺乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。ウシ由来のRhオキナーゼの分子量は、SDS-PAGEによる測定で約164kDaである。

40 【0033】本発明によるタンパク質の例としては、活性型Rhオタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するウシ由来のタンパク質であって、その分子量がSDS-PAGEによる測定で約164kDaであるタンパク質 (以下「ウシRhオキナーゼ」ということがある) が挙げられる。

50 【0034】本発明によるタンパク質の例としては、また、活性型Rhオタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するヒト由来のタンパク質 (以下「ヒトRhオキナーゼ」ということがある) が挙げられる。

【0035】本発明によるタンパク質は、例えば、ウシ脳灰白質から実施例1に記載される方法に従って得ることができる。本明細書において、「タンパク質の誘導体」とは、タンパク質のアミノ末端（N末端）のアミノ基または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部もしくは全部、および／またはタンパク質のカルボキシル末端（C末端）のカルボキシル基または各アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部もしくは全部、および／または、タンパク質の各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基（例えば、水素基、チオール基、アミド基等）の一部もしくは全部が、適当な他の置換基によって修飾を受けたものをいう。適当な他の置換基による修飾は、例えば、タンパク質中に存在する官能基の保護、タンパク質の安全性および組織移行性の向上、あるいはタンパク質の活性の増強等を目的として行われる。

【0036】タンパク質の誘導体としては、具体的には、（1）タンパク質のアミノ末端（N末端）のアミノ基または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部もしくは全部の水素原子が、置換または非置換のアルキル基（直鎖、分岐鎖または環状であってもよい）（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、イソブチル基、ブチル基、*t*-ブチル基、シクロプロピル基、シクロヘキシル基、ベンジル基）、置換または非置換のアシル基（例えば、ホルミル基、アセチル基、カプロイル基、シクロヘキシルカルボニル基、ベンゾイル基、フタロイル基、トシル基、ニコチノイル基、ピペリジニカルボニル基）、ウレタン型保護基（例えば、*p*-ニトロベンジルオキシカルボニル基、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル基、*p*-ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基）またはウレア型置換基（例えば、メチルアミノカルボニル基、フェニルカルボニル基、シクロヘキシルアミノカルボニル基）等によって置換されたもの、並びに（2）タンパク質のカルボキシル末端（C末端）のカルボキシル基または各アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部もしくは全部が、エステル化されているもの（例えば、その水素原子がメチル、エチル、イソプロピル、シクロヘキシル、フェニル、ベンジル、*t*-ブチル、4-ピコリルにより置換されたもの）、アミド型の修飾を受けているもの（例えば、非置換アミド、C1-C6アルキルアミド（例えば、メチルアミド、エチルアミド、イソプロピルアミド）を形成しているもの）、並びに（3）タンパク質の各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基（例えば、水素基、チオール基、アミノ基等）の一部もしくは全部が、上述のアミノ基と同様の置換基あるいはトリチル基などで修飾されたもの等が挙げられる。

【0037】本発明によるタンパク質の例としては、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質およびその誘導体が挙げられる。「ウシRhキナーゼ」は、この

タンパク質を含む。配列番号1のアミノ酸配列は、例えば、そのcDNA配列を細菌等において常法に従って発現させることによって得ることができる。cDNA配列は前記アミノ酸配列の一部をコードする塩基配列、例えば、図9中二重線で示したペプチドに対応するオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、市販のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる（実施例3）。また、本発明によるタンパク質の例としては、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質およびその誘導体が挙げられる。「ヒトRhキナーゼ」は、このタンパク質を含む。

【0038】本発明によるタンパク質の例としては、更に、配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、活性型Rhタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するものが挙げられる。すなわち、ここにいう付加(addition)、挿入(insertion)、置換(substitution)、および欠失(deletion)とは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性型Rhタンパク質結合能およびプロテインキナーゼ活性を損なわない(not damage)ようなものをいう。

【0039】また、このような欠失の例は、配列番号1のアミノ酸配列から90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）と943～1068番のアミノ酸配列（Rhタンパク質結合領域）とを除いた領域またはその一部の欠失である。具体的には、1～89番、360～942番、および／または1069～1388番のアミノ酸配列あるいはこの部分配列の欠失である。

【0040】本発明の別の面によれば、配列番号1の90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）と943～1068番のアミノ酸配列（Rhタンパク質結合領域）とを有するタンパク質が提供される。

【0041】本発明によるタンパク質の例としては、更に、配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、活性型Rhタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するものが挙げられる。ここにいう付加、挿入、置換、および欠失とは、前記と同様の意味を有する。また、このような欠失の例は、配列番号4のアミノ酸配列から90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）と943～1068番のアミノ酸配列（Rhタンパク質結合領域）とを除いた領域またはその一部の欠失である。具体的には、1～89番、360～942番、および／または1069～1388番のアミノ酸配列あるいはこ

の部分配列の欠失である。

【0042】本発明の別の面によれば、配列番号4の90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）と943～1068番のアミノ酸配列（Rh oタンパク質結合領域）とを有するタンパク質が提供される。Rh oキナーゼは、主として大脳および小脳において発現されるものである（実施例3の（4）参照）。更にRh oキナーゼは、後記する抗体と免疫交差する（実施例3の（4）および実施例10参照）。

【0043】ここで、「主として大脳および小脳において発現される」とは、当業者により大脳および小脳においての発現が、他の部位と比較してより多く認められたと評価されることをいい、例えば、実施例3の（4）と同様の条件で実験した場合に大脳および小脳において発現が他の部位と比較してより多く認められたと評価されることをいう。

【0044】本発明によれば、活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないタンパク質またはその誘導体が提供される。上記タンパク質の例としては、配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないものが挙げられる。すなわち、ここにいる付加、挿入、置換、および欠失とは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性型Rh oタンパク質結合能を損なわず、かつプロテインキナーゼ活性を損なうようなものをいう。

【0045】このような欠失の例は、配列番号1の90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）またはプロテインキナーゼ活性を有するその一部を含む領域の欠失である。また、このような置換の例は、Lys121Glyである。

【0046】また、配列番号1のアミノ酸配列（但し、付加、挿入、置換および／または欠失を有する）からなる活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないタンパク質またはその誘導体は、上記付加、挿入、置換および／または欠失に加えて、そのタンパク質のRh oタンパク質結合能を損なわないような付加、挿入、置換および／または欠失を有していてもよい。

【0047】このような欠失の例は、配列番号1のアミノ酸配列から943～1068番のアミノ酸配列（Rh oタンパク質結合領域）（実施例11参照）を除いた領域またはその一部の欠失である。具体的には、1～89番のアミノ酸配列およびその部分配列、360～942番のアミノ酸配列およびその部分配列、並びに1069～1388番のアミノ酸配列およびその部分配列であ

る。

【0048】本発明の別の面によれば、配列番号1の421～1137番、438～1124番、799～1137番、943～1068番、または941～1075番のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその誘導体が提供される。これらのタンパク質は、活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さない。

【0049】前記タンパク質の例としては、また、配列番号4のアミノ酸配列からなり、前記配列番号4のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号4のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないものが挙げられる。すなわち、ここにいる付加、挿入、置換、および欠失とは、配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性型Rh oタンパク質結合能を損なわず、かつプロテインキナーゼ活性を損なうようなものをいう。

【0050】このような欠失の例は、配列番号4の90～359番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）またはプロテインキナーゼ活性を有するその一部を含む領域の欠失である。また、このような置換の例は、Lys121Glyである。

【0051】また、配列番号4のアミノ酸配列（但し、付加、挿入、置換および／または欠失を有する）からなる活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないタンパク質またはその誘導体は、上記付加、挿入、置換および／または欠失に加えて、そのタンパク質のRh oタンパク質結合能を損なわないような付加、挿入、置換および／または欠失を有していてもよい。このような欠失の例は、配列番号4のアミノ酸配列から943～1068番のアミノ酸配列（Rh oタンパク質結合領域）（実施例11参照）を除いた領域またはその一部の欠失である。具体的には、1～89番のアミノ酸配列およびその部分配列、360～942番のアミノ酸配列およびその部分配列、並びに1069～1388番のアミノ酸配列およびその部分配列である。

【0052】本発明の別の面によれば、配列番号4の943～1068番または941～1075番（配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列に対応）のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその誘導体が提供される。これらのタンパク質は、活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さない。

【0053】活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有しないタンパク質またはその誘導体は、また、活性型Rh oタンパク質によるRh oキナーゼのキナーゼ活性の活性化を阻害する。例え

ば、実施例 13 に記載したように、インビトロにおいて、活性型 R h o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有しないタンパク質またはその誘導体の一例である配列番号 1 の 941 ~ 1075 番のアミノ酸配列を含む G S T 融合タンパク質は、活性型 R h o タンパク質による R h o キナーゼのキナーゼ活性の活性化を阻害する。このように、活性型 R h o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有しないタンパク質またはその誘導体は、活性型 R h o タンパク質による R h o キナーゼの活性化を阻害（即ち、活性型 R h o タンパク質から R h o キナーゼへのシグナル伝達を遮断）するために用いることができる。

【0054】本発明の別の面によれば、配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列からなり、前記配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列の 1 以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつ活性型 R h o タンパク質および／または R h o キナーゼの機能を阻害する、タンパク質およびその誘導体（すなわち、ドミナントネガティブ（dominant negative）R h o キナーゼ）が提供される。

【0055】活性型 R h o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有しないタンパク質またはその誘導体は、細胞内に内在的に存在する R h o キナーゼに対して優勢的に働き（dominate）、その作用が不活性的（negative）である。従って、活性型 R h o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有しないタンパク質またはその誘導体は、「ドミナントネガティブ R h o キナーゼ」の一形態である。

【0056】ドミナントネガティブ R h o キナーゼの更なる例は、配列番号 1 または 4 の 941 ~ 1075 番または 943 ~ 1068 番のアミノ酸配列、配列番号 1 または 4 の 1125 ~ 1388 番のアミノ酸配列、または 121 番の L y s が G l u によって置換された配列番号 1 または 4 の 6 ~ 553 番のアミノ酸配列からなるタンパク質である。

【0057】「活性型 R h o タンパク質および／または R h o キナーゼの機能」としては、例えば、（ストレスファイバー形成やフォーカル接着の形成等の細胞形態変化や細胞接着の誘導、血小板や白血球の凝集の誘導、平滑筋収縮の誘導、細胞質分裂の誘導、遺伝子転写活性化の誘導、腫瘍形成や癌細胞の浸潤・転移の誘導等）が挙げられる。

【0058】ドミナントネガティブ R h o キナーゼは、それを細胞内に存在させた場合に、細胞内に内在的に存在する活性型 R h o タンパク質や R h o キナーゼの機能を阻害する。例えば、実施例 15 ~ 18 に示した様に、ドミナントネガティブ R h o キナーゼの一例である配列番号 1 の 941 ~ 1075 番のアミノ酸配列を含む G S T 融合タンパク質（R h o キナーゼ（R B））、配列番

号 1 の 1125 ~ 1388 番のアミノ酸配列を含む G S T 融合タンパク質（R h o キナーゼ（P H））、または置換 L y s 121 G l y を有する配列番号 1 の 6 ~ 553 番のアミノ酸配列を含む G S T 融合タンパク質（R h o キナーゼ（C A T-K D））を S w i s s 3 T 3 細胞内にマイクロインジェクションした場合に、S w i s s 3 T 3 細胞のストレスファイバー形成およびフォーカル接着形成が阻害された。S w i s s 3 T 3 細胞のストレスファイバー形成およびフォーカル接着形成の誘導は、活性型 R h o タンパク質の代表的な生物学的な機能のひとつである（実施例 15 および 16、Ridley, A. & Hall, A., Cell 70, 389-399 (1992) および Ridley, A. & Hall, A., EMBO J., 13, 2600-2610 (1994)）。このように、ドミナントネガティブ R h o キナーゼは、それを細胞内に存在させることによって、細胞内に内在的に存在する活性型 R h o タンパク質の作用、例えば活性型 R h o タンパク質による内在性 R h o キナーゼの活性化およびストレスファイバー形成およびフォーカル接着形成を阻害するために用いることができる。

【0059】本発明によれば、また、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 R h o タンパク質結合能を有さないタンパク質またはその誘導体が提供される。ここで「プロテインキナーゼ活性」とは、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ活性を含む。

【0060】上記タンパク質の例としては、配列番号 1 のアミノ酸配列からなり、前記配列番号 1 のアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 R h o タンパク質結合能を有さないものが挙げられる。すなわち、ここにいう付加、挿入、置換、および欠失とは、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質のプロテインキナーゼ活性を損なわず、かつ活性型 R h o タンパク質結合能を損なうようなものをいう。

【0061】このような欠失の例は、配列番号 1 の 943 ~ 1068 番のアミノ酸配列または活性型 R h o タンパク質結合能を有するその一部を含む領域の欠失である。

【0062】また、配列番号 1 のアミノ酸配列（但し、付加、挿入、置換、および／または欠失を有する）からなるプロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 R h o タンパク質結合能を有さないタンパク質またはその誘導体は、上記付加、挿入、置換、および／または欠失に加えて、そのタンパク質のプロテインキナーゼ活性を損なわないような付加、挿入、置換、および／または欠失を有していてもよい。このような欠失の例は、配列番号 1 のアミノ酸配列から 90 ~ 359 番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）を除いた領域またはその一部の欠失が挙げられる。具体的には、1 ~ 89 番のアミノ酸

配列およびその部分配列、並びに 360～1388 番のアミノ酸配列およびその部分配列の欠失である。

【0063】本発明の別の面によれば、配列番号 1 の 90～359 番のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその誘導体が提供される。この様な誘導体の別の例としては、配列番号 1 の 6～553 番のアミノ酸配列を有するタンパク質がある（実施例 7、および 12～17）。このタンパク質は、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有さないものである。

【0064】前記タンパク質の例としては、また、配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、前記配列番号 4 のアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号 4 のアミノ酸配列の 1 以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有さないものが挙げられる。すなわち、ここにいう付加、挿入、置換、および欠失とは、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質のプロテインキナーゼ活性を損なわず、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を損なうようなものをいう。

【0065】このような欠失の例は、配列番号 4 の 943～1068 番のアミノ酸配列または活性型 Rho タンパク質結合能を有するその一部を含む領域の欠失である。また、配列番号 4 のアミノ酸配列（但し、付加、挿入、置換、および／または欠失を有する）からなるプロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有さないタンパク質またはその誘導体は、上記付加、挿入、置換、および／または欠失に加えて、そのタンパク質のプロテインキナーゼ活性を損なわないような付加、挿入、置換、および／または欠失を有していてもよい。

【0066】このような欠失の例は、配列番号 4 のアミノ酸配列から 90～359 番のアミノ酸配列（プロテインキナーゼ領域）を除いた領域またはその一部の欠失が挙げられる。具体的には、1～89 番のアミノ酸配列およびその部分配列、並びに 360～1388 番のアミノ酸配列およびその部分配列の欠失である。

【0067】本発明の別の面によれば、配列番号 4 の 90～359 番のアミノ酸配列または 6～553 番（配列番号 1 の 6～553 番のアミノ酸配列に対応）を有するタンパク質またはその誘導体が提供される。このタンパク質は、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有さない。

【0068】本発明のもう一つ面によれば、配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列からなり、前記配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号 1 または 4 のアミノ酸配列の 1 以上のアミノ酸が置換および／または欠失され、かつキナーゼ活性が構成的に活性化

されたタンパク質およびその誘導体（すなわち、ドミナントアクティブ（dominant active）Rho キナーゼ）が提供される。ここで、「キナーゼ活性が構成的に活性化された」とは、他の制御因子（例えば、Rho タンパク質）の有無に関係なく常にキナーゼ活性が活性化されていることをいう。欠失の例としては、前述と同様のものが挙げられる。

【0069】本発明によるプロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有しないタンパク質またはその誘導体は、細胞内に存在させた場合に、細胞内に内在的に存在する Rho キナーゼに対して優勢的に働き（dominate）、その作用がアクティブである。従って、プロテインキナーゼ活性を有し、かつ活性型 Rho タンパク質結合能を有しないタンパク質またはその誘導体は、「ドミナントアクティブ Rho キナーゼ」の一態様である。

【0070】ドミナントアクティブ Rho キナーゼは、活性型 Rho タンパク質が存在しない場合でも強い活性を示す。例えば、実施例 7、13 および 14 に記載したように、ドミナントアクティブ Rho キナーゼの一例である配列番号 1 の 6～553 番のアミノ酸配列を含む GST 融合タンパク質を用いることによって、活性型 Rho タンパク質非存在下でも、ミオシン軽鎖のリン酸化の程度を測定することができる。ドミナントアクティブ Rho キナーゼのキナーゼ活性の強さは、活性型 Rho タンパク質非存在下での天然 Rho キナーゼ（活性型 Rho タンパク質結合能およびプロテインキナーゼ活性有するタンパク質）のキナーゼ活性に比べて遥かに強く、活性型 Rho タンパク質存在下での精製 Rho キナーゼのキナーゼ活性よりも強い（実施例 7、13 および 14）。

【0071】また、ドミナントアクティブ Rho キナーゼは、それを細胞内に存在させた場合に、常にそのキナーゼ活性が活性化された状態にある。例えば、実施例 12 に記載したように、配列番号 1 の 6～553 番のアミノ酸配列を含む GST 融合タンパク質で、透過性を増した摘出平滑筋（スキンド平滑筋）を処理することにより、強い平滑筋の収縮を測定することができる。例えば、また、実施例 15～18 に記載したように、配列番号 1 の 6～553 番のアミノ酸配列を含む GST 融合タンパク質を、線維芽細胞にマイクロインジェクションすることにより、線維芽細胞におけるストレスファイバーやフォーカル接着の顕著な出現を観察することができる。ドミナントアクティブ Rho キナーゼのこれらの作用を観察するために、スキンド平滑筋や線維芽細胞に活性型 Rho タンパク質とともに投与する必要はない。なぜならば、前記のように、ドミナントアクティブ Rho キナーゼは、活性型 Rho タンパク質が存在しなくとも活性化された状態にある（構成的に（constitutively）活性化されている）からである。

【0072】以上のように、ドミナントアクティブR h o キナーゼは、活性型R h o タンパク質非存在下においても十分に強いキナーゼ活性および生物学的な作用（例えば平滑筋収縮作用、ストレスファイバーおよびフォーカル接着形成誘導作用）を示す。従って、これらは、R h o キナーゼの活性または作用を測定または観察するのに有用である。

【0073】本発明によるタンパク質は、活性型R h o タンパク質結合能とプロテインキナーゼ活性とを有するもの、あるいはこれらのいずれかを失わせるように改変されたものである。また、R h o タンパク質は腫瘍の形成、転移、血小板や白血球の凝集をはじめとして細胞形態、細胞運動、細胞接着、ストレスファイバーやフォーカル接着の形成、細胞質分裂等の細胞の機能発現に密接にかかわっている（前掲Takai, Y., et al.、G.C.Prendergast, et al.、Khosravi-Far, R., et al.、R. Qiu et al.、Lebowitz, P., et al., およびYoshioka, K. et al.）。従って、本発明によるタンパク質は、腫瘍の形成および転移、血小板や白血球の凝集の機構解明に有用である。

【0074】また、R h o タンパク質は、平滑筋収縮に関与することが知られている（前掲K. Hirata et al. および M. Noda et al.）。従って、本発明によるタンパク質は、高血圧症、血管攣縮（心血管攣縮および脳血管攣縮）、狭心症、心筋梗塞、および閉塞性動脈硬化症のような種々の循環器系疾患の機構の解明にも有用である。

【0075】塩基配列

本発明によれば、本発明によるタンパク質をコードする塩基配列が提供される。この塩基配列の典型的配列は、配列番号2のDNA配列の一部または全部を有するものである。この塩基配列の典型的配列は、また、配列番号5のDNA配列の一部または全部を有するものである。

【0076】配列番号2のDNA配列は、前記のようにウシ脳由来のcDNAライブラリーから得られたものである。このDNA配列は、ウシR h o キナーゼのオープンリーディングフレームを含み、オープンリーディングフレームは1～3番のATGから始まり、4165～4167番のTAAで終了する。

【0077】配列番号5のDNA配列は、ヒト脳由来のcDNAライブラリーから得られたものである。このDNA配列は、ヒトR h o キナーゼのオープンリーディングフレームを含み、オープンリーディングフレームは1～3番のATGから始まり、4165～4167番のTAAで終了する。

【0078】本発明によるタンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、配列番号1または4に記載されるアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明によるタンパク質をコードする塩基配列と

は、配列番号2または5に記載のDNA配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードするDNA配列であって縮重関係にあるコドンとDNA配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応するRNA配列も含まれる。

【0079】本発明による塩基配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよい。また、天然物由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。塩基配列は、染色体ライブラリーまたはcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法、等によって得ることができる。本発明による塩基配列は、例えば、ウシ脳cDNAライブラリーから図9中二重線で示されたペプチドに対応するオリゴヌクレオチドをスクリーニングの際のプローブとして用いることによって得ることができる（実施例3参照）。

【0080】塩基配列が天然由来のものである場合、その起源は特に限定されず、ウシおよびヒトを含む哺乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0081】本発明によるタンパク質をコードする塩基配列の例は、配列番号2の1～4167番のDNA配列（オープンリーディングフレームに相当）、配列番号2の1261～3411番、2395～3411番、2821～3225番もしくは2827～3204番のDNA配列（活性型R h o タンパク質結合領域に相当）、1312～3372番のDNA配列（コイルドコイル領域に相当）、268～1077番もしくは16～1659番のDNA配列（キナーゼ触媒領域に相当）、3373～4164番のDNA配列（PH領域に相当）、配列番号5の2395～3411番、2821～3225番もしくは2827～3204番のDNA配列（活性型R h o タンパク質結合領域に相当）、268～1077番のDNA配列（キナーゼ領域に相当）、3373～4164番のDNA配列（PH領域に相当）である。

【0082】ベクターおよび形質転換された宿主細胞
本発明によれば、前記の本発明による塩基配列を、ベクターが宿主細胞内で複製可能な状態で、かつその塩基配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含むベクターが提供される。更に、本発明によれば、このベクターによって形質転換された宿主細胞が提供される。この宿主ベクター系は特に限定されず、また、他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。融合タンパク質発現系としては、MBP（マルトース結合タンパク質）、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）、HA（ヘマグルチニン）、ポリヒスチジン、myc、Fas等を用いたものが挙げられる。

【0083】ベクターとしては、プラスミドベクター（例えば、原核細胞、酵母、昆虫細胞動物細胞等での発

現ベクター)、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、HIVベクター、バキュロウイルスベクター)、リポソームベクター(例えば、カチオニックリポソームベクター)等が挙げられる。

【0084】本発明によるベクターは、これを実際に宿主細胞に導入して所望のタンパク質を発現させるためには、前記の本発明による塩基配列の他に、その発現を制御する配列や宿主細胞を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいてもよい。また、このベクターは、本発明による塩基配列を反復した形で(例えば、タンデムで)含んでいてもよい。これらは常法に従いベクターに導入してよく、このベクターによる宿主細胞の形質転換の方法も、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0085】本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

【0086】また、宿主細胞としては、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞(例えば、COS細胞、リンパ球、繊維芽細胞、CHO細胞、血液系細胞、腫瘍細胞等)が挙げられる。上記形質転換された宿主細胞を適当な培地で培養し、その培養物から上記した本発明によるタンパク質を得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、本発明によるタンパク質の製造法が提供される。形質転換された宿主細胞の培養およびその条件は、使用する細胞についてのそれと本質的に同様であってよい。また、培養液からの本発明によるタンパク質の回収、精製も常法に従って行うことができる。

【0087】形質転換される細胞が例えばがん患者体内のガン細胞(例えば、白血病細胞、消化器ガン細胞、肺ガン細胞、スライムガン細胞、卵巣ガン細胞、子宮ガン細胞、メラノーマ細胞、脳腫瘍細胞等)であるときは、その前記の本発明による塩基配列を含むベクターをヒトを含む生体内のガン細胞に適当な方法によって導入することによって、本発明によるタンパク質を発現させることにより、悪性腫瘍等について遺伝子治療を行うことができる。

【0088】例えば、本発明によるタンパク質(活性型Rh oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有さないタンパク質)がヒトを含む生体内で発現されることにより、活性型Rh oタンパク質がこれに結合し(Rh oキナーゼと活性型Rh oタンパク質との結合を阻害し)、その結果として活性型Rh oタンパク質からRh oキナーゼへのシグナル伝達が遮断され、Rh oタンパク質が関与する腫瘍の形成または転移を抑制できる。遺伝子治療用のベクターについては、高久史磨監修の実験医学(増刊号)第12巻、第15号「遺伝子治療の最前線」(1994年)を参照することができ

る。

【0089】用途/医薬組成物

ドミナントネガティブRh oキナーゼは、活性型Rh oタンパク質やRh oキナーゼの作用を阻害する。

【0090】活性型Rh oタンパク質は、腫瘍の形成および転移を促進する。第一に、活性型Rh oタンパク質には、弱いながらも腫瘍形成活性が見出せる(Perona, R. et al., *Oncogene* 8, 1285-1292 (1992))。第二に、Rh oタンパク質を活性化するGDP/GTP交換タンパク質が、プロトオンコジーンとして機能することが知られている。Rh oタンパク質を活性化するGDP/GTP交換タンパク質には、Db l、V a v、O s t、L b c等が知られている(Collard, J., *Int. J. Oncol.*, 8, 131-138 (1996)*)。これらのタンパク質はすべて、それらのN末側が欠失すると、N I H 3 T 3 トランスフォーメーション・アッセイにおいて腫瘍形成作用を示す(Ron, D. et al., *EMBO J.*, 7, 2465-2473 (1988), Eva, A. et al., *Nature* 316, 273-275 (1985), Katzav, S. et al., *EMBO J.*, 8, 2283-2290 (1989), Horii, Y. et al., *EMBO J.*, 13, 4776-4786 (1994), Toksoz, D. et al., *Oncogene* 9, 621-628 (1994))。従って、これらのプロトオンコジーンによって活性化されるRh oタンパク質は、腫瘍形成を促進すると考えられる。第三に、最近、ヒトの腫瘍の約30%に関与するオンコジーン産物である活性型R a sタンパク質の下流にRh oシグナル伝達経路が位置し、活性型R a sタンパク質の腫瘍形成作用の少なくとも一部は、活性型Rh oタンパク質を介することが明らかになった(Prendergast, G. et al., *Oncogene* 10, 2289-2296 (1995), Khosravi-Far, R. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6443-6453 (1995), Qiu, R. et al., *Cell*, 92, 11781-11785 (1995))。最後に、活性型Rh oタンパク質によって、細胞周期が促進されることがわかっている(Yamamoto, M. et al., *Oncogene* 10, 1935-1945 (1993), Olson, M. et al., *Science* 269, 1270-1272 (1995))。以上より、活性型Rh oタンパク質は腫瘍形成を促進する。

【0091】腫瘍形成ばかりでなく、活性型Rh oタンパク質は腫瘍の転移を促進する。癌細胞は転移の過程で、血管内皮細胞や中皮細胞層などの宿主(患者)のバリアを越えて浸潤する。例えば、Imamura, F. et al., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 193, 497-503 (1993)によれば、コンフルエントになった中皮細胞層の上に高い転移能を示す腹水癌細胞(MM1細胞)を重層培養すると、MM1細胞は中皮細胞の間隙より中皮細胞層下に進入し、浸潤巣を形成する。この現象は、転移の過程での癌細胞の浸潤をよく現している。MM1の細胞浸潤は、血清存在下あるいはLPA存在下で著しく亢進する。この血清やLPAの亢進作用は、Rh oタンパク質阻害剤(ボツリヌス菌の菌体外酵素C3)で阻害されることから、活性型Rh oタンパク質を介していることが

わかっている。このことは、活性型R h oタンパク質（R h o^{v+114}）の遺伝子を導入したMM1細胞が、血清もL P Aも存在しない条件で中皮細胞層に浸潤すること（Yoshioka, K. et al., FEBS Lett., 372, 25-28 (1995)）により確かめられた。以上より、活性型R h oタンパク質は癌細胞の浸潤や転移を促進する。

【0092】本発明者等は、後記する実施例において、ドミナントネガティブR h oキナーゼにより、活性型R h oタンパク質によるR h oキナーゼの活性化が阻害できること、およびL P Aによって細胞に誘導されるストレスファイバーとフォーカル接着の形成が阻害できることを見出した。活性型R h oタンパク質の機能を阻害できることから、ドミナントネガティブR h oキナーゼは活性型R h oタンパク質が促進する上記の腫瘍形成または転移の抑制剤（以下「腫瘍形成等抑制剤」という）として用いることができる。加えて、細胞接着能の亢進を阻害することから、ドミナントネガティブR h oキナーゼは、一般的に、細胞接着能が亢進している腫瘍の転移の抑制剤として用いることができる。

【0093】ここで、腫瘍形成および転移としては、R h oが関与する腫瘍の形成、他の低分子量Gタンパク質（例えば、R a s、R a c、C d c 4 2、R a l等）が関与する腫瘍の形成、低分子量Gタンパク質のG D P / G T P交換タンパク質（例えば、D b 1、O s t等）が関与する腫瘍の形成、リソフォスファチジン酸（L P A）が関与する腫瘍の形成、受容体型チロシンキナーゼ（例えば、P D G F受容体、E G F受容体等）、転写制御タンパク質（m y c、p 5 3等）または種々のヒト腫瘍ウイルスが関与する腫瘍の形成等が挙げられる。

【0094】また、本発明者らは、平滑筋に存在するミオシン軽鎖フォスファターゼおよびそのサブユニットの一つであるミオシン結合サブユニット（Y. h. Chen. et al., FEBS Lett., 356, 51-55 (1994)）が、R h oキナーゼの最も適した生理的基質であること（実施例2の（3）、実施例5および実施例6）、ミオシン軽鎖フォスファターゼ（ミオシン結合サブユニットを含む）がリン酸化されると該フォスファターゼ活性が抑制されること（実施例5および実施例6）、R h oキナーゼを内因的に発現していると考えられる細胞においてR h oタンパク質を発現させるとミオシン結合サブユニットおよびミオシン軽鎖がリン酸化されること（実施例6）を見出した。

【0095】更に、本発明者らは、R h oキナーゼがG T P結合R h oタンパク質依存的な様式で単離ミオシン軽鎖および無傷のミオシンのミオシン軽鎖の双方をリン酸化すること（実施例7）、R h oキナーゼによるミオシン軽鎖の主なリン酸化部位がミオシン軽鎖キナーゼによりリン酸化されるS e r - 1 9であること（実施例8）、無傷のミオシンのミオシン軽鎖のリン酸化は、ミオシン軽鎖のM g A T Pアーゼ活性を増加すること（実

施例9）、プロテインキナーゼ活性が恒常的に活性化されたR h oキナーゼ誘導体が平滑筋収縮を促進すること（実施例12）を見出した。

【0096】従って、以下の理論に拘束されるわけではないが、R h oタンパク質は下記のメカニズムで平滑筋収縮を促進すると考えられる。

（1）活性型R h oタンパク質がR h oキナーゼへ結合することによりR h oキナーゼのキナーゼ活性が亢進される。

10 （2）上記R h oキナーゼによってミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットがリン酸化される。

（3）上記リン酸化により、ミオシン軽鎖フォスファターゼのフォスファターゼ活性が抑制され、ミオシン軽鎖の脱リン酸化が阻害される。

（4）脱リン酸化が抑制された結果、ミオシンはリン酸化されたままとなる。

（5）また、（1）のR h oキナーゼによってミオシン軽鎖がリン酸化される。

20 （6）現象（4）および（5）より、ミオシンとアクチンとの重合が促進されるとともに脱重合が抑制される。

（7）以上の結果、平滑筋収縮が促進されるとともに持続する。

尚、上記モデルを図22に示した。

【0097】このように、ドミナントネガティブR h oキナーゼは、平滑筋収縮抑制剤や平滑筋収縮が関与する種々の循環器系疾患（高血圧症、血管攣縮（心血管攣縮および脳血管攣縮）、狭心症、心筋梗塞、および閉塞性動脈硬化症など）の治療剤として用いることができる。

30 【0098】本発明によるドミナントネガティブR h oキナーゼは、それを細胞内に存在させた場合に、細胞内に内在的に存在する活性型R h oタンパク質の作用を阻害する。例えば、実施例15および16に示した様に、ドミナントネガティブR h oキナーゼの一例である配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列を含むG S T融合タンパク質をS w i s s 3 T 3細胞内にマイクロインジェクションした場合に、S w i s s 3 T 3細胞のストレスファイバー形成およびフォーカル接着形成の誘導が阻害された。ストレスファイバー形成およびフォーカル接着形成の誘導は、活性型R h oタンパク質の代表的な生物学的な機能のひとつである（Ridley, A. & Hall, A., Cell 70, 389-399 (1992) および Ridley, A. & Hall, A., EMBO J., 13, 2600-2610 (1994) および実施例15および16）。このように、ドミナントネガティブR h oキナーゼは、それを細胞内に存在させることによって、細胞内に内在的に存在する活性型R h oタンパク質の作用を阻害することができる。

【0099】活性型R h oタンパク質により、細胞接着または細胞凝集が誘導される。細胞接着または細胞凝集としては、例えば、血小板の凝集（Mori, N. et al.,

J. Biol. Chem., 29, 20921-20926 (1992)) および白血球 (リンパ球) の凝集 (Tominaga, T. et al., J. Cell Biol., 120, 1529-1537 (1993) およびLaudanna, C. et al., Science 271, 981-983 (1996)*) が挙げられる。前掲Morii, N. et al. (1992) によれば、トロンビンやphorbol myristate acetate (PMA) によって誘導される $g p I I b - I I I a$ 複合体依存的な血小板凝集は、ボツリヌス菌の菌体外酵素C3 (以下C3菌体外酵素と呼ぶ) により阻害された。また、Tominaga, T. et al. (1993) によれば、PMAで誘導されるリンパ球機能関連抗原 (LFA-1) 依存的なリンパ球の凝集も、C3菌体外酵素により阻害された。さらに、前掲Laudanna, C. et al. (1996)*) によれば、フォルミルペプチド (formyl peptide; fMLP)、インターロイキン8 (IL8) あるいはPMAにより刺激されたリンパ球や好中球の細胞接着も、C3菌体外酵素により阻害された。そして、そのC3菌体外酵素は、リンパ球の $\alpha 4 \beta 1$ および好中球の $\beta 2$ インテグリンを介した接着を阻害することによるものであった。以上のように、活性型Rhオタンパク質は細胞接着および細胞凝集を誘導するが、その細胞接着および細胞凝集は細胞接着分子 (血小板の $g p I I b - I I I a$ 複合体、リンパ球のLFA-1や $\alpha 4 \beta 1$ 、好中球の $\beta 2$ インテグリン) を介する。これらの細胞接着分子はすべて、インテグリン・ファミリーに含まれる (Hynes, R. et al., Cell 69, 11-25 (1992))。以上により、活性型Rhオタンパク質により、インテグリンを介した細胞接着が促進される。

【0100】ストレスファイバーはアクチンとミオシンを構成成分として有する。本発明者らは、後記する実施例において、活性型Rhオタンパク質によりRhオキナーゼが活性化され、それによりアクチンとミオシンの重合が促されることを示した。最近、活性型Rhオタンパク質によるアクチンとミオシンの重合 (contractility) がストレスファイバーおよびフォーカル接着の誘導に必須であることが示された (Chrzanowska, M. & Burridge, K., J. Cell Biol., 133, 1403-1415 (1996)*)。前記のように、活性型Rhオタンパク質はインテグリンを介した細胞接着および細胞凝集を誘導する。一方、インテグリンはフォーカル接着を担う細胞表面の接着斑 (adhesion plaque) に局在し、接着斑は細胞内に伸びるストレスファイバーの起点となることが知られている。活性型Rhオタンパク質によるアクチンとミオシンの重合 (即ちストレスファイバー形成) の誘導はインテグリンの α 鎖と β 鎖の界合を促し、そして形成された α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーを核とした接着斑が形成されることにより細胞が接着および凝集できるようになると考えられる。

【0101】以上のことを総合すると、以下の理論に拘束されるわけではないが活性型Rhオタンパク質は下記のメカニズムで細胞接着および細胞凝集を誘導すると考

えられる。

(1) 細胞が様々な刺激 (例えば、トロンビン、フォルミルペプチド、IL8やLPA刺激等) を受ける。

(2) 細胞内のRhオタンパク質が活性化される。

(3) 活性型Rhオタンパク質により、Rhオキナーゼが活性化される。

(4) 活性化Rhオキナーゼにより、ミオシン軽鎖がリン酸化されるとともに、ミオシン軽鎖ホスファターゼが抑制されるために被リン酸化ミオシン軽鎖のレベルが上昇する。

(5) 被リン酸化ミオシンにより、ミオシンとアクチンの重合が促進され、ストレスファイバーが形成される。

(6) その結果、インテグリンのヘテロダイマーが促進され、接着斑が形成し、細胞が接着および凝集する。

【0102】本発明者らは、前記および後記する実施例に示したように、ドミナントネガティブRhオキナーゼによって、Rhオキナーゼの活性あるいは活性型Rhオタンパク質によるRhオキナーゼの活性化が阻害されること、およびそれにより細胞のストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成が阻害されることを示した。上記モデルによれば、ドミナントネガティブRhオキナーゼはまた、インテグリンが関与する細胞接着および細胞凝集を阻害することは明らかである。また、このような細胞接着・凝集により、細胞が活性化されることがわかっている。従って、ドミナントネガティブRhオキナーゼは、インテグリンが関与する血小板凝集と活性化、免疫担当細胞 (Tリンパ球およびBリンパ球) の凝集・接着と活性化、炎症性血液系細胞 (好中球、好酸球、好塩基球やマクロファージ) の接着・凝集と活性化等を阻害することは明らかであり、抗血小板薬、抗炎症薬、抗アレルギー薬、自己免疫疾患 (慢性関節リウマチやSLE等) 等の治療薬として用いることができる。

【0103】本発明による抑制剤および治療剤は、後述する遺伝子治療剤を含む意味で用いられる。

【0104】本発明による抑制剤および治療剤は、また、経口または非経口投与 (例えば、筋注、静注、皮下投与、直腸投与、経皮投与、経鼻投与など)、好ましくは経口投与することができ、薬剤として経口または非経口投与に適した種々の剤型で、ヒトおよびヒト以外の動物に使用される。

【0105】抑制剤および治療剤は、例えばその用途に応じて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠などの経口剤、静注および筋注などの注射剤、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤などのいずれかの製剤形態に調製することができる。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、例えば、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤などを用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤として

は、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、でん粉、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0106】薬剤中における本発明のタンパク質の含有量はその剤形に応じて異なるが、通常全組成物中約0.1～約50重量%、好ましくは約1～約20重量%濃度である。種々の抑制および治療のための投与量は、用法、患者の年齢、性別、症状の程度などを考慮して適宜決定されるが、通常成人1日当り約0.1～約500mg、好ましくは約0.5～約50mg程度とするのがよく、これを1日1回または数回に分けて投与することができる。

【0107】本発明によれば、ドミナントネガティブRhoキナーゼを、腫瘍が形成されている細胞、その腫瘍が転移する恐れのある細胞、平滑筋の収縮が亢進している細胞、あるいは炎症や自己免疫が亢進している細胞に存在させることを含む、腫瘍形成または転移の抑制方法、平滑筋収縮の亢進抑制方法、炎症や自己免疫の亢進抑制方法、および血小板の凝集の亢進抑制方法が提供される。この場合の有効投与量、投与方法、および投与形態等は、前記腫瘍形成等抑制剤に準ずることができる。

【0108】ドミナントネガティブRhoキナーゼをコードする塩基配列は、これを有する前記ベクターを用いて、あるいはこの配列単独で標的細胞を形質転換し、腫瘍の形成または転移を抑制する様な態様で、平滑筋収縮の亢進を抑制するような態様で、あるいは炎症や自己免疫の亢進を抑制するような態様で用いることができる。すなわち、該塩基配列は腫瘍形成または転移抑制用遺伝子治療剤、循環器系疾患遺伝子治療剤、炎症性疾患または自己免疫疾患遺伝子治療剤、あるいは血小板凝集阻害用遺伝子治療剤として用いることができる。

【0109】スクリーニング法

本発明によれば、(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型Rhoタンパク質と、活性型Rhoタンパク質結合能を有する本発明によるタンパク質とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)活性型Rhoタンパク質と、活性型Rhoタンパク質結合能を有する本発明によるタンパク質との結合の阻害の程度を測定することを含む、活性型Rhoタンパク質と、活性型Rhoタンパク質結合能を有する本発明によるタンパク質との結合を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0110】ここで、「結合の阻害の程度を測定する」方法としては、無細胞系での本発明によるタンパク質と組換え型GTPγS・GST-RhoAタンパク質との

結合をグルタチオンセファロースビーズを用いて測定する方法、動物細胞内(細胞系)での本発明によるタンパク質とRhoタンパク質との結合を免疫沈降とイムノブロットとを用いて測定する方法、ツー・ハイブリッド・システム(two hybridsystem)(M.Kawabata 実験医学13,2111-2120(1995)、A.B.Vojtek et al.Cell 74,205-214(1993))等が挙げられ、例えば、実施例1または4に記載される方法に準じて結合の阻害の程度を測定することができる。また、本明細書において「結合の阻害の程度を測定する」とは結合の有無の測定を含む意味で用いられるものとする。

【0111】スクリーニング系は細胞系または無細胞系のいずれであってもよく、細胞系としては、例えば、酵母細胞、COS細胞、大腸菌、昆虫細胞、線虫細胞、リンパ細胞、繊維芽細胞(3Y1細胞、NIH/3T3細胞、Rat1細胞、Balb/3T3細胞等)、CHO細胞、血液系細胞、腫瘍細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞、骨髄系細胞、グリア細胞、およびアストロサイト等が挙げられる。

【0112】スクリーニングの対象となる物質は、特に限定されないが、例えばペプチド、ペプチドのアナログ、微生物培養液、有機化合物等が挙げられる。

【0113】本発明によれば、また、(1)スクリーニングの対象となる物質を、プロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体を含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)プロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性の阻害の程度を測定することを含む、プロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0114】本発明によれば、更にまた、(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型Rhoタンパク質と、活性型Rhoタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)活性型Rhoタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性またはその活性の亢進の阻害の程度を測定することを含む、活性型Rhoタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有する本発明によるタンパク質またはその誘導体のプロテインキナーゼの活性またはその活性の亢進を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0115】「プロテインキナーゼの活性の阻害の程度」または「プロテインキナーゼ活性の亢進の阻害の程度」を測定する方法としては、本発明によるタンパク質の自己リン酸化活性または適当な基質をリン酸化する活性、または活性型Rhoタンパク質存在下でこれらの活

性の亢進の程度を測定する方法が挙げられ、例えば、実施例2および5、6～9に記載される方法に準じてプロテインキナーゼ活性の亢進の阻害の程度を測定することができる。また、本明細書において「プロテインキナーゼの活性の阻害の程度」または「プロテインキナーゼ活性の亢進の阻害の程度」を測定するとは、プロテインキナーゼの活性またはプロテインキナーゼ活性の亢進の阻害の有無の測定を含む意味で用いられるものとする。

【0116】また、後記する実施例において示される様に、「プロテインキナーゼの活性の阻害の程度」は、ドミナントアクティブRhoキナーゼを用いて測定することができる（実施例7、12および14）。この様なRhoキナーゼ誘導体はそのプロテインキナーゼ活性が恒常的に活性化した誘導体である。

【0117】また、後記する実施例において示されるように、翻訳後修飾を受けた活性型Rhoタンパク質は、修飾を受けない活性型Rhoタンパク質よりもRhoキナーゼのプロテインキナーゼ活性を強く亢進する（実施例2の（4））。従って、活性型Rhoタンパク質として翻訳後修飾を受けたものを用いると、本発明によるスクリーニングをより明確に行うことができる。

【0118】基質としては、非生理的基質（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、S6ペプチド、 α PKC、ヒストン、ビンキュリン、タリン、メタビンキュリン、カルデスモン、フィラミン、 α -アクチニン、MAP-4）、および生理的基質（例えば、ミオシン、ミオシン軽鎖、ミオシン軽鎖フォスファターゼ、そのサブユニットの一つであるミオシン結合サブユニット（MBS））が挙げられる。

【0119】後記する実施例2および5において示されるように基質としてミオシン結合サブユニットを用いると、活性型Rhoタンパク質存在下では、非存在下でのそれと比較してリン酸化が5～15倍亢進される。従って、活性型Rhoタンパク質存在下でミオシン結合サブユニットを基質として用いると本発明によるスクリーニングをより明確に行うことができる。

【0120】また、後記する実施例7において示されるように基質としてミオシン軽鎖を用いると、活性型Rhoタンパク質存在下では、非存在下でのそれと比較してRhoキナーゼのKm値が約1/5に低下する。従って、活性型Rhoタンパク質存在下でミオシンまたはミオシン軽鎖を基質として用いると本発明によるスクリーニングをより明確に行うことができる。スクリーニング系およびスクリーニング系の対象は、前記スクリーニング法と同様のものが挙げられる。

【0121】本発明によれば、（1）スクリーニングの対象となる物質を、ドミナントアクティブRhoキナーゼを存在させることによってストレスファイバーまたはフォーカル接着の形成が誘導された細胞系に存在させ、そして（2）前記細胞系のストレスファイバーまたはフ

ォーカル接着の形成の阻害の程度を測定することを含む、ストレスファイバーの形成を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0122】ここで、「ストレスファイバーの形成の阻害の程度を測定する」方法および「フォーカル接着の形成の阻害の程度を測定する」方法としては、細胞内のアクチンを蛍光標識したプローブで可視化する方法等が挙げられ、例えば、実施例15～17に記載される方法に準じて結合の阻害の程度を測定することができる。また、本明細書において「形成の阻害の程度を測定する」とは形成の有無の測定を含む意味で用いられるものとする。

【0123】細胞は、例えば、酵母細胞、COS細胞、昆虫細胞、線虫細胞、リンパ細胞、繊維芽細胞（3Y1細胞、NIH/3T3細胞、Rat1細胞、Balb/3T3細胞、Swiss3T3細胞等）、CHO細胞、血液系細胞、腫瘍細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞、骨髄系細胞、グリア細胞、およびアストロサイト等が挙げられる。

【0124】スクリーニングの対象となるものは、前記と同様のものが挙げられる。なお、本発明において、「スクリーニング法」とはアッセイを含む意味で用いられるものとする。

【0125】活性型Rhoタンパク質は、前記のように、腫瘍の形成および転移、平滑筋の収縮並びに、血小板または白血球の凝集または活性化等に密接に関わっていることが確認されている。従って、上記のスクリーニング法は、腫瘍形成または転移抑制物質、平滑筋の収縮を阻害する物質、並びに、血小板または白血球の凝集または活性化を抑制する物質等のスクリーニング法としても用いることができる。

【0126】ペプチドおよび抗体等

本発明によれば、配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号3に記載されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドが提供される。このペプチドは、ウシまたはヒトRhoキナーゼの部分アミノ酸配列を含んでなるものである。具体的には、配列番号1または4の669～681番のアミノ酸配列（13アミノ酸残基）のN末端にシステイン（Cys）を付加した14アミノ酸残基からなるペプチドである。配列番号1または4の669～681番のアミノ酸配列は、Rhoキナーゼのコイルドコイル領域内に存在する。

【0127】このペプチドは、本発明によるタンパク質に対する抗体を得るための抗原として用いることができる。また、本発明によるタンパク質（特に、Rhoキナーゼ）は、前述のように腫瘍形成または転移および平滑筋の収縮に密接に関与している。従って、本発明によるペプチドは、これらの機構の解明等に有用である。

【0128】本発明によれば配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号3に記載

10

20

30

40

50

されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドに対する抗体が提供される。本発明において、抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。

【0129】配列番号3に記載されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドとしては、配列番号3に記載されるアミノ酸配列のN末端および／またはC末端に任意のアミノ酸配列を付加したペプチドが挙げられ、これには上記の本発明によるタンパク質も含まれる。

【0130】本発明による抗体は、当業界において通常用いられる方法によって製造することができる。例えば、配列番号3に記載されるペプチドを、任意の担体（例えば、ウシ血清アルブミン）とともに動物体内（例えば、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ヒツジ）に注射し、一定期間の後に、その動物の血清を精製することによって得ることができる。

【0131】配列番号3に記載されるペプチドは、Rhキナーゼの部分アミノ酸配列（配列番号1または4の669～681番のアミノ酸配列）を含んでなるものである。従って、このポリクローナル抗体の特異的な反応（すなわち、免疫反応）は、Rhキナーゼおよびその改変タンパク質の存在の1つの指標となる。

【0132】従って、本発明のもう一つの面によれば、上記抗体によって認識されるタンパク質、および本発明によるタンパク質であって上記抗体によって認識されるものが提供される。

【0133】また、本発明の更にもう一つの面によれば、（1）検出の対象となる物質を本発明による抗体を含む検出系に存在させ、そして（2）検出の対象となる物質と本発明による抗体との反応の程度を測定することを含んでなる、本発明による抗体によって認識される物質の検出法が提供される。本発明による抗体との反応の程度を測定する方法としては、ELISA法、ラジオイムノアッセイ法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、および蛍光抗体法（例えば、単クローン抗体実験マニュアル、講談社、（1987年））等が挙げられ、例えば、実施例3の（4）に記載される方法に準じて反応の程度を測定することができる。また、本発明において「反応の程度を測定する」とは、反応の有無を測定することをも含む。

【0134】本発明による検出法における検出系は、本発明によるポリクローナル抗体に加えて、例えば、ラテックス粒子等を含んでいてもよい。更に、本発明によれば、本発明による抗体を含んでなる、前記抗体と特異的に反応する物質の検出キットが提供される。ここで「検出キット」には、本発明によるタンパク質が関与する疾患等の検出試薬並びに診断試薬や診断キットも含まれるものとする。

【0135】本発明による検出法の実例としては、

（1）検出の対象となる物質を本発明による抗体を担持してなるラテックス粒子を含む検出系に存在させ、そし

て（2）前記ラテックス粒子の凝集反応の程度を測定することを含んでなる、前記抗体と特異的に反応する物質の検出法が挙げられる。ラテックス粒子の凝集反応の程度は、例えば、比濁法、比ろう法のような光学的測定法によって測定することができる。

【0136】本発明による検出キットは、上記検出系と同様に、ラテックス粒子を含んでいてもよい。この場合、ラテックス粒子は抗体をその表面上に担持していてもよい。また、更にラテックス粒子を含む本発明による検出キットは、前記した検出法の実例に示されるような態様で用いることができる。検出の対象となる物質としては、ヒトを含む動物由来の体液（例えば、血清、血液等）、尿、便、組織切片、細胞（例えば腫瘍細胞等）等が挙げられる。

【0137】本発明によるポリクローナル抗体と特異的に反応する物質としては、ウシまたはヒトRhキナーゼおよびその誘導体（配列番号1および4のアミノ酸配列669～681番を含む）並びに配列番号3に記載されるペプチドを含んでなるタンパク質等が挙げられる。

【0138】本発明によるポリクローナル抗体と特異的に反応する物質（例えば、ウシまたはヒトRhキナーゼ）は、活性型Rhタンパク質によりそのプロテインキナーゼ活性が亢進される。また、Rhキナーゼのプロテインキナーゼの生理的基質は、後記実施例によって示されたように、ミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットや無傷のミオシンである。更に、ミオシン結合サブユニットを含むミオシン軽鎖フォスファターゼは、前記のように平滑筋の収縮に起因する種々の循環器系疾患（例えば、高血圧症、血管攣縮（心血管攣縮および脳血管攣縮）、狭心症、心筋梗塞、および閉塞性動脈硬化症）に関与していることが明らかになっている。

【0139】従って、上記検出法および検出キットは、本発明によるタンパク質が関与する疾患、Rhタンパク質、ミオシン軽鎖フォスファターゼ、ミオシン結合サブユニット、ミオシン、またはミオシン軽鎖が関与する疾患、例えば、循環器系疾患、の検出法および検出キット（検出試薬、診断試薬および診断キットを含む）としても用いることができる。

【0140】

【実施例】本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 活性型Rhタンパク質結合タンパク質の精製とその同定

（1）脳膜抽出液の調製

ウシ脳灰白質（200g）を飲みで切って小片にし、300mlのホモジナイズ用バッファー（25mM Tris/HCl、pH7.5、5mM EGTA、1mM ジチオスレイトール（DTT）、10mM MgCl₂、10μM（p-アミジオノフェニル）-メタンスル

ホニル フルオリド、1mg/l ロイペプチン、10% スクロース)に懸濁し粗膜画分とした。粗膜画分のタンパク質を、4M NaClを含むホモジナイズ用バッファーを添加することにより抽出した。4℃で1時間振とうした後、膜画分を20,000×gで1時間、4℃で遠心分離した。上清画分をバッファーA(20mM Tris/HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 5mM MgCl₂)に対して3回透析した。その後、固形硫酸を、最終濃度が40%飽和濃度となるように添加した。0-40%硫酸で沈殿した沈殿物を16mlのバッファーAに溶解し、再びバッファーAに対して3回透析した後、ウシ脳膜抽出液として利用した。

【0141】(2) 低分子量Gタンパク質アフィニティー・カラムの調製

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(以下「GST」とする)-RhoA、GST-RhoA^{A1-37}、GST-Rac1およびGST-H-Rasは、H. Shimizu et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411(1994)、H. Shimizu et al., J. Biol. Chem., 269, 22917-22920 (1994)に記載の方法により精製し、グアニン・ヌクレオチドをロードした。GST-低分子量Gタンパク質(各24nmol)を1mlのグルタチオン-セファロースカラム4Bに固定化し、カラムにつめた。

【0142】(3) GST-低分子量Gタンパク質アフィニティー・カラム・クロマトグラフィー

ウシ脳膜抽出液を、1mlのグルタチオン-セファロースカラムにかけた。溶出画分を、24nmolのGST、GDP・GST-RhoA、あるいはGTPγS・GST-RhoAを含むグルタチオン-セファロースカラムにロードした。なお、GTPγSは、加水分解されないGTPのアナログである。グルタチオン-セファロースカラムに結合したタンパク質を、グルタチオンまたは1%のCHAPS(3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸)を含む10mlのバッファーAで溶出し、溶出画分を1mlづつ回収した。溶出画分の一部を、U. K. Laemmli, Nature, 227, 680-685 (1970)に掲載された方法によりSDS-PAGEを行い、銀染色した。結果は図1に示される通りであった。分子量約164kDaのタンパク質(ウシRhoキナーゼ)が、2-10の画分に溶出された。ウシRhoキナーゼは、GTPγS・GST-RhoAを含むグルタチオン-セファロースアフィニティーカラムのみから溶出され、GSTカラム、あるいはGDP・GST-RhoAカラムからは溶出されなかった。また、ウシRhoキナーゼは、GTPγS・GST-RhoA^{A1-37}(エフェクター領域にアミノ酸置換を有するRhoA変異タンパク質)からもほとんど溶出されなかった。ウシRhoキナーゼは、GTPγS・GST

-Rac1やGTPγS・GST-H-Rasのアフィニティーカラムからも溶出されなかった。このように、ウシRhoキナーゼはエフェクター領域を介して活性型RhoAに特異的に結合することが明かとなった。

【0143】(4) ウシRhoキナーゼの精製

ウシRhoキナーゼを精製するために、GTPγS・GST-RhoAを含むグルタチオン-セファロースアフィニティーカラムからの溶出画分(画分3-10)を同量のバッファーAで希釈し、バッファーAで平衡化したMono Q5/5カラムにロードした。カラムを10mlのバッファーAで洗浄後、タンパク質を、0-0.5MのNaCl溶液の直線密度勾配に調整したバッファーAで溶出し、溶出画分を0.5mlづつ回収した。結果は図2に示される通りであった。ウシRhoキナーゼは、画分10-12にシングルピークとして回収された(図2上段)。溶出画分(8-14)の一部を、SDS-PAGEを行い、銀染色したところ、精製サンプルの純度は約95%であった(図2下段)。

【0144】(5) オーバーレイアッセイによるRhoタンパク質結合タンパク質の同定

Manserら(E. Manser et al., J. Biol. Chem., 267, 16025-16028 (1992))によって既に記載された方法を改良して、オーバーレイアッセイを行った。サンプルを6%のSDS-PAGEにかけた後、ニトロセルロース膜にブロッティングした。ニトロセルロース膜を4℃で、5分間、6Mのグアニジン塩酸を含むバッファーB(25mM Hepes/NaOH, pH7.0, 0.5mM MgCl₂, 0.05% トリトンX-100)中でインキュベートした後、さらに3分間バッファーB中でインキュベートした。これを4回繰り返した後、6Mのグアニジン塩酸を含むバッファーBを等量加えた。ニトロセルロース膜を10分間振とうし、さらに等量のバッファーBを10分毎に5回加えた。ニトロセルロース膜をバッファーBに浸してから、1%のウシ血清アルブミン(BSA)、0.1% トリトンX-100、0.5M MgCl₂、5mM DTTを含むリン酸塩バッファー(PBS)の中に移した。ニトロセルロース膜を、[³⁵S]GTPγS・GST-RhoA、または[³⁵S]GTPγS・GST-RhoA^{A1-37}を含む0.5mlのGAPバッファー(25mM Hepes/NaOH, pH7.0, 2.5mM DTT, 5mM MgCl₂, 0.05%トリトンX-100, 100mM GTP)に10分間浸した。ニトロセルロース膜は、25mM Hepes/NaOH, pH7.0, 5mM MgCl₂, 0.05%トリトンX-100を含むPBSで3回洗浄した後乾燥させて、X線フィルムに暴露しオートラジオグラフィーを行った。尚、[³⁵S]GTPγSは、DuPont New England Nuclear社から購入した。

【0145】結果は図3に示される通りであった。膜抽

出液中の粗精製ウシRhoキナーゼも精製ウシRhoキナーゼも、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ に結合するが、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}^{\text{A1}\cdot\text{37}}$ には結合しなかった。このことから、活性型RhoAタンパク質はエフェクタードメインを介して直接ウシRhoキナーゼと結合していることが示唆された。一方、ウシRhoキナーゼは $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-Rac1}$ には結合しなかった。

【0146】実施例2 ウシRhoキナーゼのキナーゼ活性試験

ウシRhoキナーゼがリン酸化活性を持つかを調べるために、以下の実験を行なった。キナーゼ活性試験は、精製したウシRhoキナーゼ(10ngタンパク質量)を用いて、 $2\mu\text{M}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (600-800MBq/mmol)を含む50μlのキナーゼバッファー(50mM Tris/HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 5mM MgCl_2 , 0.06% CHAPS)中で、基質(ミエリン塩基性タンパク質、S6ペプチド、またはプロテインキナーゼCの疑似基質を基に合成したセリンを含んだ合成ペプチド $[\alpha\text{PKC}]$ 、各40μM)の存在下または非存在下で行った。30℃で10分間インキュベート後、自己リン酸化を調べるために、反応溶液をSDSサンプルバッファー中で煮沸して、SDS-PAGEにかけた。放射能標識されたバンドは、オートラジオグラフィーにより検出した。反応溶液は、キナーゼ活性試験をするためにワットマンp81ペーパーにスポットした。 ^{32}P の基質への取り込みは、シンチレーションカウンターで計測した。結果は以下に示される通りであった。尚、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は、Amersham社から購入した。

【0147】(1) 活性型RhoAタンパク質によるウシRhoキナーゼの自己リン酸化活性の亢進は図4に示される通りであった。精製されたウシRhoキナーゼは、インビトロで $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で自己リン酸化能を示した。この自己リン酸化能は、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ (レーン3)により約2倍にまで亢進されたが、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}^{\text{A1}\cdot\text{37}}$

(レーン4)や $\text{GDP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ (レーン2)の亢進効果は $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ よりも小さかった。なお、用いたGST-RhoAの濃度は各1μMであった。

【0148】(2) 非生理的基質を使用した場合における活性型RhoAタンパク質によるウシRhoキナーゼ活性の亢進は図5および図6に示される通りであった。ウシRhoキナーゼは、ミエリン塩基性タンパク質、S6ペプチド、 αPKC を基質として使用した場合にも、GST-RhoA非存在下でこれらをリン酸化した(図5および図6)。ウシRhoキナーゼによるミエリン塩基性タンパク質、S6ペプチド、 αPKC のリン酸化は、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ により亢進されたが、G

DP·GST-RhoAの亢進効果は非常に低かった(図5)。ウシRhoキナーゼによるS6ペプチドのリン酸化は、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ で促進されたが、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-H-Ras}$ および $\text{GDP}\cdot\text{GST-H-Ras}$ は全く促進効果を示さず、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}^{\text{A1}\cdot\text{37}}$ 、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-Rac1}$ および $\text{GDP}\cdot\text{GST-Rac1}$ は痕跡程度の促進効果を示すのみであった(図6)。このように、上記3種の基質の内、S6ペプチドがウシRhoキナーゼの基質として最も適していた。なお、用いたGST-低分子量タンパク質の濃度は各1μMであった。

【0149】(3) 活性型RhoAタンパク質によるウシRhoキナーゼキナーゼ活性を亢進する生理的基質タンパク質の検索を行った結果は図7に示される通りであった。Rhoタンパク質は細胞骨格の再編成に関係していると考えられているので、ウシRhoキナーゼによる細胞骨格制御タンパク質であるビンキュリン(vinculin)、タリン(talin)、メタビンキュリン(metavinculin)、カルデスモン(caldesmon)、フィラミン(filamin)、ビメンチン(vimentin)、 α -アクチニン(E. A. Clark & J. S. Brugge, Science, 268, 233-239 (1995))、MAP-4(H. Aizawa et al., J. Biol. Chem., 265, 13849-13855 (1990))、ミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニット(Y. H. Chen et al., FEBS Lett., 356, 51-55(1994))のリン酸化について、上記の条件に準じて検討した。ただし、ミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットについては、ラットのミオシン結合サブユニットのC末端(アミノ酸配列の699~976番の配列)とマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形態で用いた。この融合タンパク質は、常法により大腸菌で発現したものを精製することにより調製した。その結果、ウシRhoキナーゼはGST-RhoA非存在下または存在下で、これらの基質をリン酸化した。ビンキュリン、タリン、メタビンキュリン、カルデスモン、フィラミン、ビメンチン、 α -アクチニンまたはMAP-4を基質として用いた場合には、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{RhoA}$ 存在下でのリン酸化の亢進の程度は低かった(データ省略)。しかしながら、ミオシン結合サブユニット(50nM)を基質として用いると、 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ 存在下で、リン酸化の程度は著しく亢進した(図7)。 $\text{GTP}\gamma\text{S}\cdot\text{GST-RhoA}$ 存在下でのミオシンサブユニットのリン酸化の亢進の程度は、非存在下でのそれと比較して、約15倍であった(図7)。なお、用いたGST-RhoAの濃度は各1μMであった。

【0150】(4) RhoAの翻訳後修飾の影響 Rasタンパク質の翻訳後の修飾が、酵母のアデニルクラゼ(H. Horiuchi et al., Mol. Cell. Biol., 12, 4515-4520 (1992))やRasタンパク質依存性MA

Pキナーゼキナーゼキナーゼ (B-Raf) (T. Itoh, et al., J. Biol. Chem., 268, 3025-3028(1993)) では重要なことが知られている。Racタンパク質の翻訳後の修飾も、NADPHオキシダーゼの活性化には重要である (S. Ando et al., J. Biol. Chem., 267, 25709-25713(1992))。そこで、RhoAタンパク質の翻訳後の修飾が、ウシRhoキナーゼのキナーゼ活性の亢進に影響を及ぼすかどうかを検討した。H. Horiuchi et al., Mol. Cell. Biol., 12, 4515-4520 (1992) および T. Itoh et al., J. Biol. Chem., 268, 3025-3028(1993) に記載の方法に準じて、翻訳後修飾RhoAタンパク質を作製した。これを用いて、前述の方法に従って、ウシRhoキナーゼのキナーゼ活性への影響を調べた。結果は図8に示される通りであった。翻訳後修飾されたGTPγS結合型RhoAタンパク質は、非修飾型よりもS6ペプチドのリン酸化活性を亢進した。

【0151】実施例3 ウシRhoキナーゼのアミノ酸配列およびこれをコードするDNA配列等

(1) ペプチド断片の配列決定

精製したウシRhoキナーゼをSDS-PAGEにかけた後、ポリビニリデン・ジフルオライド膜にトランスファーした。ウシRhoキナーゼに相当するバンドを、リジルエンドペプチダーゼ、アクロモバクター・プロテアーゼI、およびエンドプロテイナーゼAsp-Nで消化し (A. Iwamatsu, Electrophoresis, 13, 142-147(1992))、得られたペプチド断片をC18カラムクロマトグラフィーにより分離し、アミノ酸配列を決定した。37種のペプチド断片が得られた。

【0152】(2) cDNA クローニング

ウシRhoキナーゼをコードするcDNAをクローニングするために、ウシ脳cDNAライブラリー (合計1.2×10⁶の独立したブランク) (クロンテック社) を、精製したウシRhoキナーゼで決定された部分アミノ酸配列 (図9に示したアミノ酸配列の二重下線で示した部分) に相当するデジェネレート・オリゴ・プローブでスクリーニングした。ライブラリーをスクリーニングするときのハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) に記載されている方法に準じて行った。cDNAの塩基配列を決定するために、単離したλgt10ファージのポジティブクローンに挿入されていたcDNAをpBluescript II SK (-) (M. A. Altting-Mees & J. M. Short, Nucleic Acids Res., 17, 9494(1989)) にクローン化し、ABI社のDNAシーケンサー373Sで配列を決定した。

【0153】(3) 配列分析

ウシRhoキナーゼcDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号2および配列番号1に示される通りであった。cDNA塩基配列から予想される

ウシRhoキナーゼは、1388アミノ酸残基からなり、計算上の分子量は160,797Daとなり、SDS-PAGEで測定した分子量である約164kDaと類似していた。決定した37種のペプチド断片全てがcDNA塩基配列から予想されるウシRhoキナーゼアミノ酸配列に含まれており、これらは図9のアミノ酸配列の下線で示される。ウシRhoキナーゼの構造の中には、N末端の260アミノ酸からなる配列 (配列番号1の90~359番のアミノ酸配列に相当) にセリンスレオニンキナーゼの一つであるマイトニック・ディストロフィー・キナーゼ (J. D. Brook et al., Cell, 68, 799-808(1992)、Y. H. Fu et al., Science, 255, 1256-1258(1992)、M. Madadevan et al., Science, 255, 1253-1255 (1992)) のキナーゼドメインと72%の相同性を示す特徴的な配列が存在することが明らかになった。ウシRhoキナーゼの構造の中央には、ミオシン・ロッドと相同性を示すコイルド・コイル領域が (配列番号1の438~1124番のアミノ酸配列に相当)、C末端側にはジンク・フィンガー領域が (配列番号1の1261~1315番のアミノ酸配列に相当) 存在することが明らかとなった。

【0154】ウシRhoキナーゼのキナーゼ領域、コイルド・コイル領域、プレクストリン・ホモロジー (PH) 領域とマイトニック・ディストロフィー・キナーゼのそれらを比較した結果は図10に示される通りであった。タンパク質のホモロジー検索は、BLAST プログラムにより行った (S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990))。

【0155】(4) 抗体生産とイムノプロット解析による組織特異的発現の解析

常法により、ウシRhoキナーゼの部分アミノ酸配列669~681 (KRQLQERFTDLEK) に対するウサギ・ポリクローナル抗体を作製するため、合成ペプチド (CKRQLQERFTDLEK: 配列番号3のアミノ酸配列に相当) を抗原とし、担体としてウシ血清アルブミンを用いて、常法に従って、ウサギを免疫し、血清を精製した。

【0156】ウシRhoキナーゼのイムノプロット解析は、E. Harlow & D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988) に記載の方法により実施した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを対象に用いて、M. Bradford, Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976) に記載の方法により実施した。また、ウサギで作製した抗ウシRhoキナーゼ抗体がラットのRhoキナーゼと交差反応を示すことを確認した。

【0157】結果は、図11に示される通りであった。ウシRhoキナーゼの組織特異的な発現を調べるためにラットの組織を使った。Rhoキナーゼの発現は、大脳と小脳で顕著であり、心臓、脾臓、胸線、肺および腎臓

での発現は弱く、骨格筋、肝臓および脾臓での発現はほとんど認められなかった。

【0158】実施例4 活性型Rhokinaseと組換えウシRhokinaseとの結合

(1) プラスミド構築

インビトロ翻訳によりウシRhokinaseのコイルドコイル領域のタンパク質を得るために、pGEM-HA-Rhokinaseを次のようにして構築した。ウシRhokinaseのうち配列番号1の421～1137番のアミノ酸配列に相当する部分をコードする2.2kbのcDNAを、ウシRhokinase cDNA (実施例3(2))からPCRにより、プライマー5' ATAA GGATCCCTACTAAGTGACTCTCCAT CTTG3'、および5' TATAGGATCCTTA ACTGCCTATACTGGAACCTATCC3'を用いて増幅した。この増幅cDNA断片をpGEM-HAのBamHIサイトにクローン化した。

【0159】(2) インビトロ翻訳

pGEM-HA-Rhokinaseを、説明マニュアルに記載されている条件で、TNT T7と共役したレティキュラーサイト・ライセートの系(Promega社製)を用いてインビトロ翻訳を行い、ウシRhokinaseのコイルドコイル領域のタンパク質を得た。グアニン・ヌクレオチド(各0.75nmol)をロードしたGST-低分子量Gタンパク質を、31μlのグルタチオンセファロース4Bビーズに固定化して、310μl(10倍量)のバッファーAで洗浄した。固定化ビーズを、30μlのインビトロ翻訳産物混合液に加え、これに最終濃度が1mg/mlになるようにウシ血清アルブミンを添加し、4℃で1時間穏和に振とうした。ビーズは、102μl(3.3倍量)のバッファーAで6回洗浄して、結合しているタンパク質をGST-低分子量Gタンパク質と共に10mMグルタチオンを含む102μl(3.3倍量)のバッファーAで3回溶出した。最初の溶出液をSDS-PAGEにかけ、真空乾燥後オートラジオグラフィーを行った。結果は図12に示される通りであった。

【0160】インビトロ翻訳で得たウシRhokinaseのコイルドコイル領域のタンパク質は、GTPγS・GST-Rhokinaseアフィニティービーズと結合し、グルタチオンによりGTPγS・GST-Rhokinaseとともに溶出された(レーン3)。一方、GST(レーン1)、GDP・GST-Rhokinase(レーン2)、GTPγS・GST-Rhokinase^{A1137}(レーン4)、GTPγS・GST-Rac1(レーン6)、あるいはGTPγS・GST-H-Ras(レーン8)のアフィニティービーズには結合しなかった。ウシRhokinaseのコイルドコイル領域付近のタンパク質(配列番号1の799～1137番のアミノ酸配列)を用いた場合でも、本質的に同一の結合パターンが観察された(データ省略)。

このことは、GTPγS・GST-Rhokinaseは、ウシRhokinaseのCoiled-Coil領域と直接結合していることを示している。尚、後述(実施例11)する様に、ツー・ハイブリッドシステムを用いてヒトRhokinase内のRhokinase結合領域を決定した。その結果、ウシRhokinaseのRhokinase結合領域は、配列番号1の943～1068番のアミノ酸配列であると推定された(図10)。

【0161】実施例5 ウシRhokinaseによるニワトリ・ミオシン結合サブユニットのリン酸化とこれによるミオシン軽鎖ホスファターゼ活性の抑制

(1) ウシRhokinaseによるニワトリ・ミオシン結合サブユニットリン酸化試験

ウシRhokinaseはニワトリのミオシン結合サブユニットを用いた場合でも、これをリン酸化した。ニワトリのミオシン結合サブユニット(Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994))のC末端側のペプチド断片(アミノ酸753～1004)とマルトース結合タンパク質との融合タンパク質(MBS-C)を実施例2(3)に記載の方法に準じて作製し、これを基質として用いて、実施例2(3)に記載の方法に準じてウシRhokinaseによるリン酸化の程度を測定した(図13)。その結果、ウシRhokinaseによるMBS-Cのリン酸化の程度は、コントロール(GST存在下、レーン1)に比べ、GTPγS・GST-Rhokinase存在下で5倍以上亢進した(レーン3)。対照的に、GDP・GST-Rhokinase(レーン2)、GTPγS・GST-Rhokinase^{A1137}(レーン4)、GDP・GST-Rac1(レーン5)、GTPγS・GST-Rac1(レーン6)ではリン酸化の亢進は認められなかった。また、ニワトリのミオシン結合サブユニット(Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994))のN末端側のペプチド断片(アミノ酸1～721)を、MBS-Cのかわりに基質として用いた場合は、ウシRhokinaseはこれをリン酸化しなかった(データ省略)。

【0162】(2) ウシRhokinaseによるニワトリ・ミオシン軽鎖ホスファターゼ活性の抑制

ニワトリ砂囊からの天然のミオシン軽鎖ホスファターゼの精製は、Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994)に記載の方法に従って実施した。様々な濃度の天然ウシ脳由来のウシRhokinase存在下で、ミオシン軽鎖ホスファターゼのリン酸化を測定した(実験1)。また、様々な濃度のウシRhokinase存在下でリン酸化したミオシン軽鎖ホスファターゼの酵素活性を測定した(実験2)。

【0163】その結果、ウシRhokinaseの濃度依存的に、ミオシン軽鎖ホスファターゼ中のミオシン結合サブユニットがリン酸化されること、およびウシRhokinaseによるリン酸化により、ミオシン軽鎖ホスファ

ーゼの酵素活性が抑制されることが明かとなった。図14は、以上の独立した2つの実験（実験1および実験2）の結果を合わせて、ウシRhoキナーゼの濃度を横軸に取って示したものである。尚、実験1および実験2の具体的な方法は下記に示したとおりである。

【0164】ウシRhoキナーゼによる天然のミオシン軽鎖ホスファターゼのリン酸化（実験1）は、種々の量のウシRhoキナーゼ存在下、1 μ MのGTP γ S・GST-RhoA存在下または非存在下で、精製したミオシン軽鎖ホスファターゼ（1.0 μ gタンパク量）を含む40 μ lのパッファー（34mM Tris/HCl, pH 7.5, 34mM KCl, 4.0mM MgCl₂, 1.625mM EDTA, 1.2mM DTT, 1.3% シュクロース, 0.38% CHAPS, 10 μ M [³⁵S] ATP γ S）中で行なった。3分間インキュベート後、反応混合液をSDS-PAGEにかけた後、ミオシン結合サブユニットの被リン酸化の程度をオートラジオグラフィー（Fuji BAS-2000）により測定した。

【0165】ミオシン軽鎖ホスファターゼ活性に及ぼすリン酸化の影響（実験2）を調べるために、上記と同様の方法により精製したミオシン軽鎖ホスファターゼ

（1.0 μ gタンパク量）を、放射能で標識しない10 μ M ATP γ Sの存在下または非存在下、1 μ MのGTP γ S・GST-RhoA存在下または非存在下で、種々の濃度のウシRhoキナーゼによりリン酸化した。反応は5 μ lの46mMEDTAを加えて停止した。次に5 μ lの放射標識したミオシン軽鎖を含む30mM Tris/HCl, pH 7.5, 30mM KCl, 0.5mM DTTを加えて、トータル50 μ lの反応混合液（5 μ M ³²P-ミオシン軽鎖を含む）として反応を開始した。反応は30℃にて6分間行なった。反応を停止した後、ミオシン軽鎖に結合した³²Pの量をIshihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 871-877 (1989) に記載の方法により測定した。

【0166】結果は、図14に示すように、ウシRhoキナーゼ濃度依存的に³⁵S-チオリン酸がミオシン結合サブユニットに取り込まれた。一方、ATP γ S存在下では、ウシRhoキナーゼ濃度依存的にミオシン軽鎖ホスファターゼ活性の抑制が見い出されたが、この抑制はATP γ S非存在下では見られなかった。以上の結果より、ウシRhoキナーゼによりリン酸化を受けると、ミオシン軽鎖ホスファターゼの酵素活性が抑制されることが明かとなった。

【0167】実施例6 NIH/3T3細胞内でのRhoタンパク質によるミオシン結合サブユニットおよびミオシン軽鎖のリン酸化の亢進の測定

下記に記載する様に、NIH/3T3細胞内で、Rhoタンパク質によってミオシン結合サブユニットのリン酸

化が亢進するかどうかについて検討した。製造企業（Stratagene社）の使用説明書に基づき、NIH/3T3細胞に、p3' SSおよびpOPRSVI-HA-RhoAまたはpOPRSVI-HA-RhoA^{V¹¹⁴}を安定的にトランスフェクションした。これらのプラスミドはIPTG制御下にヘマグルチニン（HA）-RhoAまたはHA-RhoA^{V¹¹⁴}を発現させることができる。35mmディッシュ中で培養しコンフルエント（confluent）に達したNIH/3T3細胞株（親株、NIH/3T3-RhoA-5、NIH/3T3-RhoA-24、NIH/3T3-RhoA^{V¹¹⁴}-7およびNIH/3T3-RhoA^{V¹¹⁴}-25）を5mM IPTGで24時間処理した。最後の12時間は、血清を除去した培養液中で培養し、その後、9.25 MBqの [³²P] -オルトリン酸で2時間標識した。その後、³²Pで標識した細胞を溶解し、ミオシン結合サブユニットを免疫沈降させた。洗浄した免疫沈降物をSDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィーした。

【0168】上記の方法で、RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}をNIH/3T3細胞中に過剰に発現させたところ、A. J. Ridley & A. Hall, Cell 70, 389-399 (1992)およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J., 13, 2600-2610 (1994) に記載のように、高いレベルのストレス・ファイバーおよびフォーカル・コンタクト形成が観察された。ミオシン結合サブユニットの量は、親株を含む全てのNIH/3T3細胞株でほぼ同程度だった（データ省略）が、RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン結合サブユニットのリン酸化の程度は、親株のNIH/3T3細胞内のミオシン結合サブユニットのリン酸化の程度に比べて顕著に高かった（図15）。

【0169】次に、親株およびRhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度を、下記に記載の方法に従って測定した。IPTG処理および血清除去操作を100mmディッシュ中で行ったNIH/3T3細胞株に10% TCAを添加した。ミオシン軽鎖のリン酸化の程度を決定するために、トリクロロ酢酸（TCA）沈降物をグリセロール・ウレア・ゲル電気泳動にかけ、リン酸化された（monophosphorylated (MLCP) および diphosphorylated (MLCP₂)）ミオシン軽鎖とリン酸化されていないミオシン軽鎖の相対的な量を、イムノ・プロット法（D. A. Taylor & J. T. Stull, J. Biol. Chem. 263, 14456 (1988)）により定量した。この際、細胞を、0.1 μ Mのホスファターゼ阻害剤（calyculin-A (CLA)）で10分間処理したところ、ミオシン軽鎖のリン酸化の程度は上昇した（図16）。RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度は、親株のN

I H / 3 T 3 細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度に比べて明かに高かった (図 16)。異なる 3 株の R h o A または R h o A^{V⁸¹¹⁴}を過剰に発現させた N I H / 3 T 3 細胞を用いて、本質的に同一の結果が得られた。

【0170】以下の理論に拘束されるわけではないが、以上の結果は、発現誘導させた R h o A または R h o A^{V⁸¹¹⁴}により、N I H / 3 T 3 細胞内に内因的に存在する R h o キナーゼが活性化された結果、ミオシン結合サブユニットのリン酸化が亢進し、ミオシン軽鎖ホスファターゼ活性が阻害され、これによって、ミオシン軽鎖の脱リン酸化が抑制されたと解釈される。

【0171】実施例7 ウシR h o キナーゼおよびその欠失変異体によるミオシン軽鎖のリン酸化

無細胞系において、ウシR h o キナーゼ変異体が単離ミオシン軽鎖をリン酸化するかどうかを検討した。具体的には下記の方法に従って実験を行った。ミオシン軽鎖 (Hathaway, D. R. & Haerberle, J. R. Anal. Biochem. 135, 37-43(1983))、ミオシンおよびミオシン軽鎖キナーゼ (Ikebe, M., & Hartshorne, D. J. J. Biol. Chem. 260, 10027-10031 (1985)) は、凍結したニワトリの砂囊から精製した。精製ウシR h o キナーゼは、ウシの脳から精製した (実施例1)。

【0172】また、ウシR h o キナーゼの触媒領域断片とG S Tとの組換え融合タンパク質 (R h o キナーゼ (C A T)) を、下記に記載の方法に従って作製した。ウシR h o キナーゼの触媒領域断片 (配列番号1の6~553番のアミノ酸配列) をコードするc D N A断片を、プラスミドp A c Y M 1 - G S T (Matsuura, Y. et al., J. Gen. Virol. 68, 1233-1250 (1987)) のB a m H 1 部位中に挿入した。得られたプラスミドを用い、Matsuura, Y. et al., J. Gen. Virol. 68, 1233-1250 (1987)に記載の方法に従って、バキュロウイルス・システムを利用することによって、S f 9細胞 (A T C C C R L 1711) にR h o キナーゼ (C A T) を生産させ、これを精製した。

【0173】ウシR h o キナーゼおよびその欠失変異体についてのキナーゼ反応は、50 μ l の反応混合液 (50 mM T r i s - H C l (p H 7.5)、2 mM E D T A、1 mM D T T、7 mM M g C l₂、0.15% C H A P S、250 μ M [γ -³²P] A T P [1~20 G B q / m m o l]、精製ウシR h o キナーゼ [20 n g のタンパク質] またはウシR h o キナーゼ (C A T) および示した量のミオシン軽鎖またはミオシン (1 μ M G T P γ S \cdot G S T \cdot R h o A 存在下、または非存在下) 中で実施した。ミオシン軽鎖キナーゼについてのキナーゼ反応は、50 μ l の反応混合液 (50 mM T r i s - H C l (p H 7.5)、1 mM M g C l₂、85 mM K C l、500 μ M [γ -³²P] A T P [0.5~5 G B q / m m o l]、精製ミ

オシン軽鎖キナーゼ [50 n g のタンパク質] および示した量のミオシン軽鎖またはミオシン (0.1 mM C a C l₂ および10 μ g / m l カルモジュリン存在下または非存在下) 中で実施した。30 $^{\circ}$ Cにおいて10分間インキュベートした後、反応混合液をS D S - 試料バッファー中で煮沸し、S D S - P A G E にかけた。S D S - P A G E は過去に記載された方法 (Laemmli, U. K. Nature 227, 680-685 (1970)) に従って実施した。放射性標識されたバンドを画像解析装置 (F u j i) により可視化した。

【0174】その結果、ウシR h o キナーゼ (C A T) がミオシン軽鎖をリン酸化することを見出した (図17)。G T P γ S \cdot G S T - R h o A は精製ウシR h o キナーゼによるミオシン軽鎖のリン酸化を増強したが、G D P \cdot G S T - R h o A またはG T P γ S \cdot G S T - R h o A^{A1a37} は増強しなかった (図17)。因みに、R h o A^{A1a37} はR a s^{A1a35} と構造上同等である。R a s^{A1a35} は、エフェクタードメインの中にアミノ酸置換を含有し、その置換によりR a s^{A1a35} はその標的と結合することができない (Sato, T. et al., J. Biol. Chem. 267, 24149-24152(1992)、McCormick, F., Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 71-76(1994))。また、G T P γ S \cdot G S T - R a c 1 も効果がなかった。構成的に活性化されている組換えウシR h o キナーゼ (ウシR h o キナーゼ (C A T)) もミオシン軽鎖をリン酸化した。同様な条件下で、ミオシン軽鎖キナーゼはC a²⁺-カルモジュリン依存的な様式でミオシン軽鎖をリン酸化した (図17)。また、ウシR h o キナーゼが、無傷 (i n t a c t) のミオシンのミオシン軽鎖を、G T P γ S \cdot G S T - R h o A 依存的な様式でリン酸化することを見出した (図17)。最大約1モルのリン酸塩が、1モルの単離されたミオシン軽鎖または無傷のミオシンのミオシン軽鎖の中に、G T P γ S \cdot G S T - R h o A の存在下で、精製ウシR h o キナーゼによって、あるいはウシR h o キナーゼ (C A T) によって、取り込まれた (データ省略)。因みに、ミオシン軽鎖キナーゼおよびプロテインキナーゼCのような特定のキナーゼは、無傷のミオシンをstoichiometricalな様式でリン酸化することが知られている (Tan, J. L. et al., Annu. Rev. Biochem. 61, 721-759(1992))。

【0175】精製ウシR h o キナーゼに対する単離されたミオシン軽鎖の見掛けの親和性は、種々の濃度のミオシン軽鎖のリン酸化を測定することによって推定された (図18)。G T P γ S \cdot G S T - R h o A の存在下または非存在下におけるミオシン軽鎖についての見掛けのK m 値は、それぞれ、2.6 \pm 0.4 および12.6 \pm 1.6 μ M であり、そして分子の活性 (molecular activities) は0.26 \pm 0.03 および0.15 \pm 0.02 s e c⁻¹であった。従って、G T P γ S \cdot G S T - R h o A はミオシン軽鎖に対するウシR h o キナーゼの

10

20

30

40

50

親和性を亢進 (increase) し、リン酸化反応の最大速度を生成 (produce) するように思われた。ウシRhoキナーゼ (CAT) の見掛けのKm値および分子活性はそれぞれ $0.91 \pm 0.07 \mu\text{M}$ および $0.67 \pm 0.09 \text{ sec}^{-1}$ であった。ミオシン軽鎖に対するミオシン軽鎖キナーゼの見掛けのKm値および分子活性 (molecular activity) は、前述の条件の下で、それぞれ、 $52.1 \pm 7.1 \mu\text{M}$ および $2.0 \pm 0.36 \text{ sec}^{-1}$ であった。ミオシン軽鎖に対するウシRhoキナーゼのKm値は、ミオシン軽鎖キナーゼのそれより低い。このことより、ウシRhoキナーゼはより低い濃度においてミオシンをリン酸化するが、ウシRhoキナーゼの分子活性はミオシン軽鎖キナーゼのそれより低いことが示された。精製ウシRhoキナーゼの分子活性がウシRhoキナーゼ (CAT) のそれより低かった理由は、精製過程で精製ウシRhoキナーゼの活性が失活したという事実 (データ省略) により説明することができる。

【0176】実施例8 ウシRhoキナーゼおよびその欠変異体によってリン酸化されるミオシン軽鎖のリン酸化部位の決定

ミオシン軽鎖は、優先的にSer-19が、次にThr-18がミオシン軽鎖キナーゼによりリン酸化される。

(Ikebe, M. & Hartshorne, D. J. J. Biol. Chem. 260, 10027-10031 (1985))。そして、Ser-19のリン酸化はアクチンによるミオシンATPアーゼの活性化に必須である (Kamisoyma, H. et al., Biochemistry 33, 840-847(1994)、Bresnick, A. R. et al., Biochemistry 34, 12576-12583(1995))。ミオシン軽鎖はSer-1、Ser-2およびThr-9においてプロテインキナーゼCによりリン酸化され、そしてプロテインキナーゼCによるこのリン酸化はミオシンATPアーゼによるアクチン活性化を阻害する (Nishikawa, M. et al., J. Biol. Chem. 259, 8808-8814(1984)、Bengur, A. R. et al., J. Biol. Chem. 262, 7613-7617(1987)、およびIkebe, M. & Reardon, S. Biochemistry 29, 2713-2720(1990))。

【0177】ウシRhoキナーゼによるミオシン軽鎖の主要なリン酸化部位を決定するために、ウシRhoキナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼまたはプロテインキナーゼCによりin vitroでリン酸化されたミオシン軽鎖のペプチドマッピングを実施した。ミオシン軽鎖のリン酸化ペプチドのマッピング分析は記載されている方法 (Naka, M. et al., Nature 306, 490-492(1983)) に従って実施した。その結果、ウシRhoキナーゼによりリン酸化されたミオシン軽鎖の2次元ペプチドマッピングのパターンは、ミオシン軽鎖キナーゼにより生成されたそれと同一であったが、プロテインキナーゼCにより生成されたそれと異なっていた (図19)。

【0178】次に、リン酸化アミノ酸の分析を、記載されている方法 (Hunter, T. & Sefton, B. M., Proc. Na

tl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 1311-1315(1980)) に従って実施した。その結果、ウシRhoキナーゼによるリン酸化はミオシン軽鎖の主としてセリン残基と一部のスレオニン残基において起こること、そしてミオシン軽鎖キナーゼによるリン酸化はミオシン軽鎖のセリン残基

(Ser-19) においてのみ起こることが明らかとなった (データ省略)。このような条件では、ミオシン軽鎖キナーゼはミオシン軽鎖のSer-19を優先的にリン酸化することが想起された。精製ウシRhoキナーゼの代わりにウシRhoキナーゼ (CAT) を用いた場合でも、本質的に同一の結果が得られた。

【0179】GSTタンパク質を野生型ミオシン軽鎖およびThr-18とSer-19がアラニン残基に置換されたミオシン軽鎖と融合し、ウシRhoキナーゼおよびミオシン軽鎖キナーゼがこれらの組換えタンパク質をリン酸化することができるかどうかを検討した。これらの組換えタンパク質を大腸菌で発現させるためのベクター (pGEX-ミオシン軽鎖およびpGEX-ミオシン軽鎖^{Ala18, Ala19}) は下記のようにして構築した。プラ

イマー5' AATAGGATCCGATTTAACCGCCACCATGTCG3' および5' ATAAGGATCCTCAGTCATCTTTGTCTTTTCGCTC3' を使用して、ラット脳QuickクローンcDNA (Clontech社) から、ポリメラーゼ連鎖反応により、ミオシン軽鎖をコードする0.55キロ塩基対のcDNA断片を増幅した。アラニン (Ala) によるThr-18およびSer-19の置換は、ポリメラーゼ連鎖反応により実施した (Higuchi, R. in PCR Technology (Erllich, H. A. ed) pp. 61-70, Stockton Press, New York(1989))。cDNA断片をpGEX-2TのBamHI部位中にクローン化した。

【0180】その結果、ウシRhoキナーゼおよびミオシン軽鎖キナーゼの双方がGST-ミオシン軽鎖をリン酸化したが、GSTまたはGST-ミオシン軽鎖^{Ala18, Ala19}をリン酸化しなかった (図20)。プロテインキナーゼCはGST-ミオシン軽鎖およびGST-ミオシン軽鎖^{Ala18, Ala19}の双方をリン酸化した (データ省略)。これらの結果より、ウシRhoキナーゼがミオシン軽鎖を主としてSer-19においてリン酸化すること、このSer-19はミオシン軽鎖キナーゼによりリン酸化される部位と同一であることが示された。

【0181】実施例9 アクチン活性化MgATPアーゼアッセイ

ウシRhoキナーゼが無細胞系においてミオシン軽鎖キナーゼと同等に機能するかどうかを検討するために、アクチン活性化MgATPアーゼアッセイを実施した。精製された無傷のミオシンをウシRhoキナーゼ (CAT) により1モルのミリオン当り1モルのリン酸化が起きる様にリン酸化し、次いでアクチンによって活性化されたMgATPアーゼ活性を測定した。具体的には下記

に記載の方法に従って実施した。ミオシンATPアーゼアッセイは、過去に記載されている方法 (Ikebe, M. et al., Biochemistry 23, 5062-5068 (1984)) に一部変更を加えて実施した。まず、0.1 mg/ml のミオシンを、ウシRhoキナーゼ (CAT) (450 ng のタンパク質) により0.45 ml の反応混合液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、2.2 mM EDTA、1 mM DTT、6 mM MgCl₂、1 mM EGTA、85 mM KCl、1 μM GTPγS・GST-RhoA および500 μM ATP [80~200 MBq/mmole]) 中で、30℃で20分間リン酸化した。また、0.1 mg/ml のミオシンをミオシン軽鎖キナーゼ (450 ng のタンパク質) により、0.1 mM CaCl₂ および10 μg/ml カルモジュリンを存在させる以外は同様の条件でリン酸化した。ミオシンATPアーゼ反応は、0.45 ml のATPアーゼバッファー (0.05 mg/ml リン酸化ミオシン、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM DTT、10 mM MgCl₂、0.5 mM EGTA、85 mM KCl、および1 mM ATP [80~200 MBq/mmole]) (1 mg/ml のF-アクチン存在下、または非存在下) 中で30℃で30分間実施した。反応混合液の各80 μlを示した時間に停止溶液 (1.3% チャーコール、0.12 M NaH₂PO₄ および0.33 M 過塩素酸) に添加し、濾過した。[γ-³²P] ATP から遊離した無機リン酸塩を、シンチレーションカウンターにより測定した。尚、F-アクチンは、ウサギの骨格筋から精製し (Spudich, J. A., & Watt, S. J. Biol. Chem. 246, 4866-4871 (1971))、[γ-³²P] ATP はアマシヤム社から購入した。

【0182】Rhoキナーゼ (CAT) によってリン酸化されたミオシンのMgATPase活性は増加し、その増加はF-アクチン依存的な様式であり、その増加の程度はミオシン軽鎖キナーゼによるそれと同様であった (図21)。アクチンに対する見掛けのK_a値と被リン酸化ミオシンの分子活性はそれぞれ、0.56 ± 0.05 μM および0.18 ± 0.02 sec⁻¹であった。これらの値は、ミオシン軽鎖キナーゼによってリン酸化されたミオシンに対しての値と、ほぼ同様であった。尚、天然の精製Rhoキナーゼの代わりにRhoキナーゼ (CAT) を本実験に用いた理由は、ミオシンのATPase活性を測定するのに高い濃度のミオシンが必要であるが、この実験条件下では天然の精製Rhoキナーゼを用いるとミオシンのstoichiometricalなリン酸化が見られないからである。

【0183】実施例10 ヒトのRhoキナーゼ cDNAのクローニング

ヒト脳mRNA (CLONTECH 社) 0.5 μg を鋳型としてSuperScript™ Preamplification System (BRL 社) を用いて

1st strand DNAを合成した。この反応液の1/20量を、PCRの鋳型として用い、ウシRhoキナーゼ cDNAの塩基配列をもとに合成したプライマー (5-CAT TTT CAT TTC TAG GAG ATG ATT ATT CTC TTG CTTAA C-3, 5'-AA A AAG CAC TTC TTC AGC ACA AAA ATG CAG AAT ATC AGC G-3) で、TAKARA LA PCR Kit を使ってPCRを行い、ヒトRhoキナーゼ cDNAの部分断片 (配列番号4に記載の塩基配列1151~2476) を得た。このcDNA断片をプローブとして、ヒト脳λgt10cDNAライブラリーを1.0 × 10⁶ プラークをスクリーニングした。スクリーニングは、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) の記載に準じて行った。ウシRhoキナーゼ遺伝子の塩基配列と比較した結果、得られた2つのクローン、p164-20 (配列番号5の938~3710番の塩基配列) およびC-9塩基配列 (配列番号5の2898-4365番の塩基配列) で、C末端の翻訳領域約2kbpをカバーしていることが解かった。

【0184】足りないN末端の約1kbpをクローニングするため、さらにヒト脳λgt10cDNAライブラリー1.0 × 10⁶ を、クローンp164-20をプローブとしてスクリーニングした。その結果、ひとつのクローン、N6が開始コドンを含むN末端約1kbp (配列番号5に記載の塩基配列1~929) をカバーしていることが解かった。p164-20とN6の間をカバーするcDNA断片を得るために、CLONTECH社製 Human Brain QUICK-Clone™ cDNAを鋳型として、プライマー5-CCT TTG TCA TCT TCA ATGTCA TCG A AA TTG-3 と 5-CGT GTA TGA AGA TGG ATG AAA CAG GCA TGG-3 を使いTAKARA LA-PCR kit (宝酒造社) を用いてPCRを行い塩基配列734~1145に相当するcDNA断片を増幅した。

【0185】ヒトRhoキナーゼ遺伝子の翻訳領域をカバーするこれら4つのクローンは、Stratagene社のpBluscriptII SK(-) (M. A. Alting-Mees and J. M. Short, Nucleic Acids Res., 17, 9494 (1989)) 中にクローン化した。塩基配列決定のため、Pharmacia 社製double-stranded Nested Deletion Kitを使用してdeletion mutant を作製し、ABI 社の377 DNAシーケンサーを使って配列を決定した。尚、使用したヒト脳λgt10cDNAライブラリーはCLONTECH社より購入した。

【0186】ヒトRhoキナーゼcDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および配列番号4に記載した通りであった。ヒトRhoキナーゼの推定タンパク質は、1388アミノ酸からなり、推定分子量は、約161 kDaであった。ヒトRhoキナーゼのアミノ酸配列 (配列番号4) は、ウシ (配列番号1)、ラットROKα (Leung, T. et al., J. Biol. Chem., 270, 29051-29054 (1995)) に記載されたラットROKαのアミノ酸配列は、N末端の84アミノ酸を欠いて

いるが、その後完全長のアミノ酸配列がデータベースに登録された (EMBL Data Bank accession number U38481)。以下、ラットROK α のアミノ酸配列番号はこのデータベースに記載の配列番号に則り記載する) と高い同一性を示し、全長のヒトRhokinaseのアミノ酸と、ウシRhokinaseおよびラットROK α のそれらと、それぞれ97%および95%の同一性を示した。N末端側にキナーゼドメイン、中央にRhokinase結合領域 (実施例11) を含むコイルドコイル・ドメイン、C末端側には、ジンクフィンガー様モチーフが存在した。ヒトRhokinaseのキナーゼドメイン (配列番号4の90~359番のアミノ酸配列) は、アミノ酸レベルで、ウシRhokinase (配列番号1の90~359番のアミノ酸配列) と98%、ラットROK α (アミノ酸配列88~357) と97%の同一性を示した。ヒトRhokinaseのコイルドコイル・ドメイン (配列番号4の438~1124番のアミノ酸配列) は、アミノ酸レベルで、ウシRhokinase (配列番号1の438~1124番のアミノ酸配列) と97%、ラットROK α (アミノ酸配列436~1122) と95%の同一性を示した。ヒトRhokinaseのジンクフィンガー様モチーフ (配列番号4の1261~1315番のアミノ酸配列) は、アミノ酸レベルで、ウシRhokinase (配列番号1の1261~1315番のアミノ酸配列) と100%、ラットROK α (アミノ酸配列1259~1313) と98%の同一性を示した。

【0187】また、ヒトRhokinaseのアミノ酸配列 (配列番号4) の669番~681番に、ウシRhokinaseのアミノ酸配列 (配列番号1) の669番~681番と同一の配列であり、実施例3 (4) に記載の抗Rhokinase抗体によって認識されるアミノ酸配列 (KRQLQERFTDLEK) が見出された。このことより、ヒトRhokinaseも合成ペプチドCKRQLQERFTDLEKを抗原として作製した抗Rhokinase抗体 (実施例3 (4)) によって認識されることが明らかとなった。以上より、ヒトRhokinaseは、ウシRhokinaseのヒト・カウンターパートのタンパク質であると結論された。

【0188】一方、ヒトRhokinaseのアミノ酸配列 (全長) (配列番号4) は、ヒトp160^{ROCK} (Ishizaki, T., et.al. EMBO J., 15, 1885-1893 (1996) *) のそれと67%の同一性を示した。ヒトRhokinaseのキナーゼドメイン (配列番号4の90~359番のアミノ酸配列) は、ヒトp160^{ROCK}のキナーゼドメイン (Ishizaki, T., et.al. EMBO J., 15, 1885-1893 (1996) *) に記載のアミノ酸配列74~343) と92%という高い同一性を示した。このことより、ヒトRhokinaseは、ヒトp160^{ROCK}のアイソザイムであると結論した。

【0189】実施例11 ツー・ハイブリッド・システム

ムを用いたヒトRhokinaseと活性型Rhokinaseタンパク質の結合の検出

酵母を用いたツー・ハイブリッド・システムにより、以下に記載の方法に従って、ヒトRhokinaseのRhokinase結合領域を決定した。ヒトRhokinaseのアミノ酸番号943~1068に相当する塩基配列を、プライマー (5-TTG CGG CCG CTA AAG ATC ATG AAA GAG CTG GAG AT C-3', 5' TAG CGG CCG CAA CAT ATG TAGCTT TCT ATT CT C-3') を用いてPCR で増幅した後、pVP16のNotI部位に挿入し、Rhokinase-VP16-融合タンパク質発現用ベクターを作製した (Vojtek, A.B. et. al. Cell, 74, 205-214 (1993))。LiCl法 (Ito, H. et. al. J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) により、それぞれLexA-野生型H-Ras融合タンパク質、LexA-野生型Rhokinase融合タンパク質、LexA-活性型Rhokinase融合タンパク質、LexA-野生型H-Ras融合タンパク質とRhokinase-VP16-融合タンパク質、LexA-野生型Rhokinase融合タンパク質とRhokinase-VP16-融合タンパク質、LexA-活性型Rhokinase融合タンパク質とRhokinase-VP16-融合タンパク質を酵母 (S. cerevisiae) L40株 (Mat a trp1 leu2 his3 ade2 LYS2:: (LexAop)4-HIS3 URA3:: (LexAop)8-LacZ) で発現させて、選択培地 (Leu-, Trp-, His-, 200mM 3AT) 上で培養し、ヒスチジン要求性を調べた。その結果、LexA-活性型Rhokinase融合タンパク質とRhokinase-VP16-融合タンパク質を発現している株のみが、選択培地上で生存することが出来た (図23)。このことから、ヒトRhokinaseの943~1068番のアミノ酸配列もしくはその部分配列が、Rhokinase結合領域であることが明らかとなった。

【0190】ヒトRhokinaseのRhokinase結合領域と、ラットRhokinaseおよびウシRhokinaseの相当する部分のアミノ酸配列を比較した結果、ヒトRhokinase (アミノ酸配列943~1068) とラットROK α (アミノ酸配列941~1066) では98%、ヒトRhokinaseとウシRhokinase (アミノ酸配列943~1068) では98%の同一性を示した。一方、ヒトRhokinaseのRhokinase結合領域 (アミノ酸配列943~1068) とヒトp160^{ROCK}の相当する部分 (アミノ酸配列910~1039) では、53%の同一性が見られた。

【0191】実施例12 Rhokinase (CAT) によるスキンド平滑筋収縮の誘導

Rhokinaseタンパク質がミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化とその結果として起きる平滑筋の収縮を制御していることはよく知られている (Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Nature 372, 231-236 (1994); Noda, M. et al. FEBS Lett. 367, 246-250 (1995); Hirata, K. et al. J. Biol. Chem. 267, 8719-8722 (1991); Gong, M. C. e

t al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*)。Rh oタンパク質がCa²⁺感受性の亢進 (Gong, M. C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*) を引き起こすためには、拡散しうる共役因子 (diffusible cofactor) が必要である (Gong, M. C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*)。しかしながら、これまで、Rh oタンパク質を介した平滑筋収縮のCa²⁺感受性の亢進の詳細なメカニズムは不明であった (Gong, M. C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*)。

【0192】一方、本発明者らは、新規のRh o標的タンパク質であるRh oキナーゼがRh oタンパク質によって活性化され、活性化されたRh oキナーゼによりミオシン軽鎖ホスファターゼのミオシン結合サブユニット (MBS) がリン酸化されることにより抑制されること、その結果、ミオシン軽鎖の被リン酸化レベルが亢進することを見出した (実施例1~6)。また、本発明者らはRh oキナーゼが直接ミオシン軽鎖をリン酸化することも見出した (実施例7~9)。これらのデータは、Rh oキナーゼがRh oタンパク質の下流の標的タンパク質として働いていることばかりでなく、平滑筋収縮の制御において極めて重要な役割を果たすことを示している。

【0193】本発明者らは、Rh oキナーゼが、Rh oタンパク質による血管平滑筋収縮のCa²⁺感受性の亢進に必要なRh o標的タンパク質であることを確認するために下記の実験を実施した。

(1) Rh oキナーゼによるTriton X-100で処理したウサギ門脈血管の収縮の誘導
まず、本発明者等は、組換えRh oキナーゼ触媒領域 (Rh oキナーゼ (CAT)) (実施例7) をTriton X-100を用いて透過性を亢進させたウサギ門脈中膜血管 (Triton X-100-permeabilized RPV) の細胞質内に外来的に投与した際の効果について検討した。その結果、細胞質内に投与したRh oキナーゼ (CAT) により血管が収縮し、それと同時にTriton X-100-permeabilized RPV中のミオシン軽鎖の一リン酸化 (monophosphorylation) が亢進した。この効果は細胞質内のCa²⁺濃度が実質的にゼロの条件 (10 mM EGTAの緩衝作用による) においても認められた。詳細を下記に記載する。

【0194】0.5% Triton X-100を用いて透過性を著しく亢進させた Triton X-100-permeabilized RPVでは、タンパク質等の高分子量の化合物が受容体型Gタンパク質のシグナル伝達とカップリングすることなく細胞膜を通過できる。このことを利用して、0.5% Triton X-100を用いて透過性を著しく亢進させたウサギ門脈血管平滑筋 (RPV) の細胞質内に外来的にRh oキナーゼ (CAT) (分子量約80 kDa) を導入した。具体的には下記に記載の方法に従って実験を実施した。

【0195】ウサギ (2~2.5 kg) の門脈中膜血管標本の薄片 (幅50~100 μm、長さ0.5~1 mm) を切り出し、等尺性張力トランスジューサー (ミネベア社製UL-2GR) に連結し、バブル・プレート (bubble plate) 上のウェルに乗せた (Kobayashi, S. et al. J. Biol. Chem. 264, 17997-18004 (1989))。118 mM K⁺によって生じた収縮を記録した後、標本を弛緩溶液中でインキュベートし、その後0.5%のTriton X-100で20分間、25℃で処理または5000 IU/mlのα-トキシシンで60~75分間、25℃で処理した。上記に用いた溶液は過去に詳細に記載されている (Persechini, A. K. et al. J. Biol. Chem. 261, 6293-6299 (1986))。カルモジュリン (0.5 μM) を、化学的な透過性亢進を利用した実験に使用した反応溶液すべてに添加した。Rh oキナーゼ (CAT) は実施例7に記載の方法に従って作製した。

【0196】その結果、pCa 6.5 (図24aおよび図24b) およびpCa < 8.0 (図24c) において、Rh oキナーゼ (CAT) は著しい収縮を誘導した。これらの収縮はRh oキナーゼを洗浄することにより完全に元に戻った (図24b)。対照的に、microcystin-LRを用いて誘導した収縮では、洗浄によっても元に戻らなかった (図24b)。一方、無傷 (intact) の血管標本やα-toxinを用いて透過性を亢進させた血管標本では、Rh oキナーゼ (CAT) による収縮は認められなかった (データ省略)。以上の結果より、Triton X-100処理によって生じた大きな穴を通過して、Rh oキナーゼ (CAT) が平滑筋の細胞質に外来的に導入されたこと、それによって血管が収縮したことが示された。また、導入されたRh oキナーゼ (CAT) の作用が可逆的であることから、おそらくこの収縮は生理的な現象を反映しており、受容体型Gタンパク質に共役しなく細胞質内Ca²⁺濃度に依存しないものであることが示唆された。

【0197】(2) Rh oキナーゼによるTriton X-100で処理したウサギ門脈血管の収縮感受性の亢進
本発明者等は次に、細胞質に導入したRh oキナーゼ (CAT) が Triton X-100-permeabilized RPVの収縮装置 (contractile apparatus) のCa²⁺感受性を亢進する (potentiates) かどうかを確認するために、7.5 nMのRh oキナーゼ (CAT) の存在下でのpCaと張力の関係について検討した。その結果、この濃度のRh oキナーゼ (CAT) は、pCa < 8では通常張力反応を誘導しないが、pCaを増加させると収縮装置を刺激することが明らかになった。即ち、Rh oキナーゼ (CAT) は、対照に比べて最大張力反応を有意 (ANOVA解析でp < 0.05) に増強した (図25a、白丸)。Ca²⁺感受性の指標として最大張力の50%を誘導するのに必要なpCa値を示すEC₅₀値をそれぞれ決めるために、図25aに示したデータを、無

反応条件 ($pCa < 8.0$ の値) と最大反応条件 ($500 nM$ の okadaic acid の存在下または $7.5 nM$ の $Rh o$ キナーゼ (CAT) の存在下または非存在下における $pCa 4.5$) での値をそれぞれ 0% および 100% と仮定することによって再標準化した。 $Rh o$ キナーゼ (CAT) の存在下での EC_{50} 値の計算値 ($0.299 \pm 0.045 \mu M$, $n=4$) と対照の値 (0.376 ± 0.046 , $n=4$) と有意差はなかったが、1型および2A型のタンパク質ホスファターゼに対する強力な阻害剤である okadaic acid (OA) (Bialojan, C. et al. Nature 298, 81-95 (1988); Takai, A. et al. FEBS Lett. 217, 81-95 (1988)) の存在下での値 ($0.212 \pm 0.013 \mu M$, $n=4$) は対照に比べて統計的に有意差が認められた (図25a、黒丸、 $p < 0.05$)。以上の結果より、 $Rh o$ キナーゼ (CAT) は細胞内 Ca^{2+} 濃度に非依存的に収縮の感受性を亢進するが、この感受性の亢進のメカニズムはOAによるようなミオシン軽鎖ホスファターゼの阻害だけによるのではないことが示唆された。

【0198】 Ca^{2+} -カルモジュリン-ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 経路を介したミオシン軽鎖のリン酸化は、結果としてミオシン-アクチン相互作用およびそれに引き続いてミオシンATPアーゼの活性化を促すことから、平滑筋収縮において主要な役割を果たす (Kamm, K. E. & Stull, J. T. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603 (1985); Hartshorne et al. in Physiology of the gastrointestinal Tract (ed Johnson, L. R.) 423-482 (Raven Press, New York (1987); Sellers, J. R. & Adelstein, R. S. in The Enzyme Vol. 18 (eds Boyer, P. & Erevs, E. G.) 381-418 (Academic Press, San Diego, CA (1987)))。 $Rh o$ キナーゼによって誘導される収縮における Ca^{2+} -カルモジュリン-ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 経路の関与について調べるために、本発明者等は $Rh o$ キナーゼ (CAT) のcumulativeな投与によって誘導される張力形成におけるwortmannin (WM) の効果について検討した

(図25b)。その結果、生理的な Ca^{2+} 濃度である $pCa 6.5$ においては張力形成が $Rh o$ キナーゼ用量依存性を示したが、 $10 \mu M$ のWM存在下では用量依存性のカーブが下方にシフトした。 $pCa 6.5$ での結果とは対照的に、 $pCa < 8.0$ において $Rh o$ キナーゼ (CAT) によって誘導された張力形成は、 $10 \mu M$ のWMの存在下でも有意には変化しなかった (ANOVA解析で有意差なし)。

【0199】 因みに、WMは Ca^{2+} 依存的MLCKを阻害することが知られている (Nakanishi, S. et al. J. Biol. Chem. 267, 2157-2163 (1992))。また、 $Rh o$ キナーゼ (CAT) 非存在下で $pCa 6.5$ における Ca^{2+} による収縮は $10 \mu M$ のWM処理で完全に阻害された (データ省略)。以上を考慮すると、 $pCa 6.5$ に

において $Rh o$ キナーゼによって誘導される Ca^{2+} 感受性の亢進をWMが変化させる理由は、おそらく細胞質内 Ca^{2+} によって誘導される収縮それ自体を阻害することによるものであり、WMが $Rh o$ キナーゼを介した経路を阻害しているからではないと思われる。統計学的解析結果を含めて以上のデータを総合すると、 Ca^{2+} 非存在下で $Rh o$ キナーゼによって誘導される収縮は Ca^{2+} -カルモジュリン-ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 経路とは独立的なメカニズムに基づくと考えられる。

(3) $Rh o$ キナーゼによる Triton X-100で処理したウサギ門脈血管中のミオシン軽鎖のリン酸化の亢進
【0200】 $Rh o$ キナーゼ (CAT) が通常ミオシン軽鎖のリン酸化を伴う収縮を誘導するかどうかを明らかにするために、本発明者等はミオシン軽鎖のリン酸化における $Rh o$ キナーゼ (CAT) の効果について、抗ミオシン軽鎖ポリクローナル抗体を用いて検討した。具体的には下記の方法に従って実験を実施した。

【0201】 $0.255 \mu M$ の $Rh o$ キナーゼ (CAT) および/または $10 \mu M$ のwortmannin (WM) で処理した後、Triton X-100によって透過性を亢進させたフリンジ様 (fringe-like) のウサギ門脈血管標本を迅速に 10% TCA および $10 mM$ DTTを含むアセトンの凍結したslurry中に置いて収縮反応を停止させた。TCAを除いた後、標本を尿素サンプル緩衝液 ($20 mM$ トリス、 $22 mM$ グリシン ($pH 8.6$))、 $8 M$ 尿素、 $10 mM$ DTT、 10% ショ糖、 0.1% bromphenol blue) 中でホモジェナイズした後、グリセロール-尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、抗ミオシン軽鎖抗体を用いたイムノブロットングを実施した (Perschini, A. K. et al. J. Biol. Chem. 261, 6293-6299 (1986))。

【0202】 その結果、図26aのレーン1-3に示したように、 $pCa < 8.0$ では、ミオシン軽鎖のリン酸化が $Rh o$ キナーゼ (CAT) 存在下 (レーン2) でのみ検出され、そしてそれは $10 \mu M$ のWMに非感受性であった (レーン3)。一方、 $pCa 6.5$ (レーン4-6) では、 $Rh o$ キナーゼ (CAT) はミオシン軽鎖のリン酸化を有意に増強し (レーン5)、そしてそれは $10 \mu M$ のWMに感受性であった (レーン6)。以上の結果は、収縮反応における $Rh o$ キナーゼ (CAT) の効果と一致した (図26b)。従って、 $Rh o$ キナーゼ (CAT) は、おそらく Ca^{2+} -カルモジュリン-MLCKに非依存的な経路によってメディエートされるミオシン軽鎖のリン酸化レベルの亢進の結果、収縮反応を増強すると結論された。

(4) $Rh o$ キナーゼがTriton X-100で処理したウサギ門脈血管中に存在しないことの証明

【0203】 ところで、 $Rh o$ タンパク質は、 Ca^{2+} 感受性の亢進を引き起こすために、拡散性の共役因子 (diffusible cofactor) を要求する (Gong, M. C. et

al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*)。即ち、Triton X-100処理によって透過性が亢進されると、Rhoを介した情報伝達経路に関する下流の分子（これらは Ca^{2+} 感受性の亢進を引き起こすために必要な拡散性の共役因子である）が細胞から漏れて（leak）しまうために、このようなTriton X-100で強力に透過性を亢進させたRPV（extensively Triton X-100-permeabilized RPV）では、Rhoは収縮効果を発揮できないと推測される（Gong, M. C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1340-1345 (1996)*）。

【0204】そこで、本発明者等は、Rhoキナーゼが、Rhoタンパク質による Ca^{2+} 感受性の亢進に必須である上記の拡散性の共役因子であるかどうかを調べるために、extensively Triton X-100-permeabilized RPV中にRhoキナーゼが存在するかどうかを検討した。具体的には下記に記載する方法に従って実験を実施した。

【0205】0.5%のTriton X-100によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管および透過性を亢進させていない（即ち無傷(intact)な）ウサギ門脈血管を抽出緩衝液（50mM トリス-HCl（pH 7.2）、100mM NaCl、2mM EGTA、1mM EDTA、1mM DTT、0.1μM p-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride、10μg/ml ロイペプチン、1mM ベンザミジン）中でホモジェナイズした。各々の抽出液を43000rpmで30分間、4℃で遠心分離し、上清をSDS-PAGEにかけイムノブロッティングした。イムノブロット解析に用いるために、ウシRhoキナーゼのコイルドコイル領域（配列番号1の421～701番のアミノ酸配列）とGSTとの融合タンパク質（Rhoキナーゼ（COIL））を実施例13に記載の方法に準じて作製し、常法に従ってこれを抗原としてウサギを免疫することによりポリクローナル抗体を作製した。この抗Rhoキナーゼ（COIL）抗体および抗20kDaミオシン軽鎖抗体（J. T. Stull博士より提供を受けた）を用いたイムノブロット解析は、過去に記載の方法（Harlow, E. & Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988))に従って実施した。染色されたタンパク質はECL（アマーシャム社）によって可視化し、定量のためにdensitometryにかけた。

【0206】その結果、図27に示したように、本発明者等は、extensively Triton X-100-permeabilized RPVにおいて、内在性のRhoキナーゼが失われていることを見出した。図27a（レーン1、2）に示したように、extensively Triton X-100-permeabilized RPVでのRhoキナーゼの量は、無傷（intact）の組織のそれに比べて著しく減少していた。これに対してextensively Triton X-100-permeabilized RPVでのミオシン軽鎖（レ

ーン3、4）およびミオシン重鎖（レーン5、6）の量は、無傷の組織でのそれとほとんど同程度であった。図27bは図27aに示されたデータを要約したものであり、各々の値は3回の実験からの平均値±標準偏差で表されている。これらの結果より、Triton X-100処理によって強力に透過性を亢進されると、Rhoキナーゼを含む細胞質のタンパク質が失われてしまうが、ミオシン軽鎖のような細胞骨格タンパク質は安定的に存在することが確認された。以上より、外来的にRhoキナーゼ

10 （CAT）を細胞質内に導入しなければextensively Triton X-100-permeabilized RPVが収縮しない理由は、Rhoキナーゼが上記の拡散性の共役因子のひとつであるからであると考えられる。このように、本発明者等は、生理学的な条件下でRhoキナーゼによって収縮反応が誘導され、これにミオシン軽鎖のリン酸化が伴うという証拠を示した。このことより、本発明者等は、Rhoキナーゼが、Rhoタンパク質による平滑筋収縮における Ca^{2+} 感受性の亢進に関する下流の標的タンパク質であり、そしてミオシン軽鎖のリン酸化を介する平滑筋収縮に極めて重要な役割を果たすと結論した。

【0207】実施例13 ウシRhoキナーゼの欠失変異タンパク質の作製とインビトロでの特徴づけ

Rhoキナーゼは、触媒領域（CAT）、コイルドコイル領域（COIL）、Rho結合領域（RB）およびプレクストリン・ホモロジー領域（PH）より構成される。本発明者らは、それぞれの領域を含む4つの断片

（図28）をGST-融合タンパク質として作製した。まず、Rho結合領域（RB）に相当する断片を得るために、実施例4に記載の方法に準じて、Rhoキナーゼ（配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列）をコードするcDNAをpGEX-2TのBamHI部位中に挿入し、得られたプラスミドを大腸菌に発現させ、Rhoキナーゼ（配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列）とGSTとの融合タンパク質（Rhoキナーゼ（RB））を精製した。RhoとRhoキナーゼの結合は、実施例1に記載の方法に従って、オーバーレイ・アッセイによって決定した。0.25μgの精製Rhoキナーゼまたは2.5μgのRhoキナーゼ（RB）（配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列）をSDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動（12%）で分離し、これらをニトロセルロース・メンブレンにトランスファーした後、 $[^{35}S]$ GTPγS・GST-RhoAまたは $[^{35}S]$ GTPγS・GST-RhoA^{A1-37}との結合を検出した。放射能標識されたバンドをイメージアナライザーによって可視化した。その結果、GTPγS・GST-RhoAはRhoキナーゼ（RB）（配列番号1の941～1075番のアミノ酸配列）に結合したが、GTPγS・GST-RhoA^{A1-37}はそれに弱く結合した（図29）。因みに、RhoA^{A1-37}はH-Ras^{A1-35}に構造的に

等しく、H-Ras^{A135}はエフェクター結合ドメインにおける変異(スレオニンのアラニンへの置換)である(C. Nobes & A. Hall, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 77 (1994)、Y. Takai et al., Trends. Biochem. Sci. 20, 227 (1995)、T. Satoh et al., J. Biol. Chem. 267, 24149(1992)、およびF. McCormick, Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 71 (1994))。

【0208】また、ウシRhoキナーゼのコイルドコイル領域(配列番号1の421~701番のアミノ酸配列)またはRhoキナーゼのPH領域(配列番号1の1125~1388番のアミノ酸配列)をコードするcDNAを、pGEX-2TのBamHI部位に挿入し、それぞれpGEX-GST-Rhoキナーゼ(COIL)、pGEX-GST-Rhoキナーゼ(PH)を作製した。これら大腸菌に発現させ、精製することにより、Rhoキナーゼ(COIL)およびRhoキナーゼ(PH)を調製した。

【0209】次に、実施例7に記載した様に、Rho結合部位を含むC-末端の半分を欠如する組換えウシRhoキナーゼの触媒領域(CAT)(配列番号1の6~553番のアミノ酸配列)とGSTとの融合タンパク質(Rhoキナーゼ(CAT))を作製し、精製した(図28)。具体的には、Rhoキナーゼ(配列番号1の6~553番のアミノ酸配列)をコードするcDNAをpAcYM1-GSTのBamHI部位に挿入し、pAcYM1-GST-Rhoキナーゼ(CAT)(配列番号1の6~553番のアミノ酸配列)を作製した。Rhoキナーゼ(CAT)(配列番号1の6~553番のアミノ酸配列)は、バキュロウイルス系(Y. Matsuura et al., J. Gen. Virol., 68, 1233(1987))を使用して作製し、グルタチオンセファロースカラムによってSf9細胞から精製した。また、ウシRhoキナーゼ触媒領域(配列番号1の6~553番のアミノ酸配列)のATP結合部位を構成する121番目のリジンに常法に従ってグリシンに置換した変異体(Rhoキナーゼ(CAT-KD))を、Rhoキナーゼ(CAT)と同様の方法に従ってバキュロウイルス系をSf9細胞に発現させ、精製した(図28)。また、天然ウシRhoキナーゼは、実施例1に記載の方法に従って精製した。

【0210】次に、これらの組換え型および天然Rhoキナーゼのキナーゼ活性を、ミオシン軽鎖(MLC)を基質としてチェックした。Rhoキナーゼのキナーゼ反応は50μlの反応混合液(40mM Tris/HCl(pH7.5), 2mMEDTA, 1mM DTT, 6.5mM MgCl₂, 0.1% CHAPS, 0.1μM calyculin A, 100μM [γ-³²P]ATP[0.5~20 GBq/mol], 4μgのミオシン軽鎖および20ngの天然Rhoキナーゼまたは8ngのRhoキナーゼ(CAT)またはRhoキナーゼ(CAT-KD)中で、1.5μM GTPγS

・GST-RhoA存在下または非存在下で実施した以外は、実施例7に記載の方法に従って実施した。

【0211】その結果、実施例7と同等の結果が得られた。天然ウシRhoキナーゼはGTPγS・GST-RhoA依存的にミオシン軽鎖に対しキナーゼ活性を示したが、GST-Rhoキナーゼ(CAT)はGTPγS・GST-RhoAの存在に無関係にキナーゼ活性を示した(図30)。GTPγS・GST-RhoAの存在下における天然RhoキナーゼおよびGTPγS・GST-RhoAの非存在下におけるRhoキナーゼ(CAT)の分子活性は、それぞれ、0.32±0.02/secおよび0.71±0.02/secであった。これはRhoキナーゼ(CAT)が構成的に活性化されていることを示している。一方、ATP結合部位に変異を有するRhoキナーゼ触媒領域(Rhoキナーゼ(CAT-KD))にはキナーゼ活性が認められなかった(データ省略)。

【0212】Rhoキナーゼ(RB)が用量依存的に、GTPγS・GST-RhoAによって亢進された天然Rhoキナーゼの活性化を阻害したが、それがRhoキナーゼ(CAT)のキナーゼ活性に影響を与えないことを見出した(図31)。Rhoキナーゼ(RB)のIC₅₀は0.7μMであった。一方、Rhoキナーゼ(CAT-KD)、Rhoキナーゼに影響を与えなかった(データ省略)。

【0213】実施例14 スタウロスポリンによるRhoキナーゼの阻害

Rhoによって誘導されるストレスファイバーの形成はスタウロスポリン(staurosporin)のようなタンパク質キナーゼインヒビターにより阻害されることが知られている(C. D. Nobes & A. Hall, Cell 81, 53 (1995))。スタウロスポリンは用量依存的にRhoキナーゼ(CAT)のキナーゼ活性を阻害した(図31)。スタウロスポリンのIC₅₀は4nMであった。この値はタンパク質キナーゼCについて記載された値(T. Tamaoki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 397 (1986))に類似する。Rhoキナーゼ(CAT)の代わりに、GTPγS・GST-RhoAで刺激した天然Rhoキナーゼを使用した場合でも、本質的に同様な結果が得られた(図31)。

【0214】実施例15 細胞のストレスファイバー形成に及ぼすRhoキナーゼ欠失変異体のマイクロインジェクションの効果

Swiss 3T3細胞におけるストレスファイバー形成に及ぼすRhoキナーゼ(CAT)およびRhoキナーゼ(CAT-KD)の作用を検討した。Swiss 3T3細胞は、10%のウシ胎児血清を添加したDulbecco's改良Eagle's培地(DMEM)中で培養した。細胞は8~10×10³細胞の密度で12mmのガラス・カバースリップ上に播種した。4日間の培養後、血清を含ま

ないDMEM培地中で24時間培養することによって、細胞を血清飢餓状態にした。組換えタンパク質を、マーカートンパク質(1mg/mlのウサギIgG)とともに細胞の細胞質にマイクロインジェクションした。マイクロインジェクション後、細胞を37℃で30分間インキュベートした。過去に記載の方法(Ridley, A. & Hall, A., Cell 70, 389 (1992); Ridley, A. & Hall, A., EMBO J., 13, 2600 (1994))に従って、細胞内のアクチンを、TRITC標識化ファロイジン(phalloidin)によって可視化した。

【0215】その結果、過去に記載されているように(A. J. Ridley and A. Hall, Cell 70, 389 (1992)、およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J. 13, 2600 (1994))、コンフルエント血清飢餓Swiss 3T3細胞は非常に微量のストレスファイバーを有し、これらのストレスファイバーはファロイジンにより可視化された(図32a)。過去に記載された方法(A. J. Ridley & A. Hall, Cell 70, 389 (1992)、およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J. 13, 2600 (1994))に従って細胞をLPA(200ng/ml)で刺激したとき、新しいストレスファイバーが出現し、それらの数および直径が増加した(図32B)。Rhokinase(CAT)

(0.5mg/ml)のマイクロインジェクションは、また、ストレスファイバーの形成を誘導した(図32E)。Rhokinase(CAT-KD)にはこのような作用は認められなかった。注入されたRhokinase(CAT)はしばしば、細胞の中央部においてストレスファイバーと結合したアクチンフィラメントの大きい凝集形成を引き起こした(図32E、図32F)。このようなハブ様(hub-like)アクチンフィラメントが存在する理由は明らかではないが、これは注入されたRhokinase(CAT)により誘導されたストレスファイバーの高い収縮性のためかもしれない。

【0216】一方、ADPリボシル化することによってRhokinaseを阻害するボツリヌス菌の菌体外酵素C3トランスフェラーゼ(C3)(K. Aktories et al., ibid. 158, 209 (1989)、およびA. Sekine et al., J. Biol. Chem. 264, 8602 (1989))(80μg/ml)を細胞にマイクロインジェクションした場合には、過去に記載されているように(H. F. Paterson et al., J. Cell Biol. 111, 1001 (1990))、細胞は30分以内に丸くなった(データ省略)。注入されたC3はLPAによって誘導されるストレスファイバーの形成を阻害した(図32C)が、それはRhokinase(CAT)により誘導されたストレスファイバーの形成は阻害しなかった(図32F)。C3をRhokinase(CAT)とともに同時注入(coinjection)すると、細胞が丸くなるのが防止された(データ省略)。50nMのスタウロsporin存在下でLPAで刺激された細胞では、過去に記載のよう

y, P. et al., Mol. Cell, Biol. 15, 1110 (1995))不規則に配置された(randomly arranged)アクチンフィラメントが生じた(図32D)。しかしながら、スタウロsporin存在下にRhokinase(CAT)を注入された細胞ではストレスファイバーは生じなかった(図32G)。

【0217】実施例16 細胞のフォーカル接着に及ぼすRhokinase欠変異体のマイクロインジェクションの効果

Swiss 3T3細胞におけるフォーカル接着形成に及ぼすRhokinase(CAT)およびRhokinase(CAT-KD)の作用を検討した。細胞の培養、LPA濃度、マイクロインジェクションの条件、注入タンパク質の量は、実施例15に記載したものと同一であった。細胞染色については、過去に記載の方法(Ridley, A. & Hall, A., Cell 70, 389 (1992); Ridley, A. & Hall, A., EMBO J., 13, 2600 (1994))に従って、細胞内のビンキュリン(vinculin)を抗ビンキュリン抗体によって可視化した。核は、ビスベンジミド(bis-benzimide)によって可視化した。

【0218】その結果、過去に記載されているように(A. J. Ridley & A. Hall, Cell 70, 389 (1992)、およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J. 13, 2600 (1994))、コンフルエント血清飢餓Swiss 3T3細胞において、抗ビンキュリン抗体により、非常にわずかのフォーカル接着が検出された(図33A)。細胞をLPAで刺激したとき、過去に観察されたように(A. J. Ridley & A. Hall, Cell 70, 389 (1992)、およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J. 13, 2600 (1994))、ビンキュリンを含む新たなフォーカル接着が出現し、その数を増加した(図33B)。Rhokinase(CAT)のマイクロインジェクションはフォーカル接着の形成を誘導した(図33E)。本発明者らは、二重免疫蛍光分析により、注入されたRhokinase(CAT)により新しく合成されるストレスファイバーがフォーカル接着に連結されることを確認した(図33H)。C3のマイクロインジェクションはLPAによって誘発されるフォーカル接着の形成を阻害した(図33C)が、それはRhokinase(CAT)によって誘導されたフォーカル接着の形成を阻害しなかった(図33F、図31G)。

【0219】スタウロsporin(50nM)はLPAおよびRhokinase(CAT)によって誘導されたフォーカル接着形成をいずれも阻害した(図33dおよび図33g)。構成的に活性化したPKC触媒領域またはMBSの注入によっては、ストレスファイバーの形成もフォーカル接着の形成も誘導されなかった(データ省略)。これらの注入はまた、Rhokinase(CAT)によって誘導されたストレスファイバー形成およびフォーカル接着の形成に影響を及ぼさなかった(データ省略)。

【0220】実施例17 Rh oキナーゼ (RB)、Rh oキナーゼ (PH)、Rh oキナーゼ (CAT-KD) のマイクロインジェクションによるストレスファイバーおよびフォーカル接着形成の阻害

本発明者らは次に、LPAによって誘導されるストレスファイバーおよびフォーカル接着形成におけるRh oキナーゼ (RB)、Rh oキナーゼ (PH)、Rh oキナーゼ (CAT-KD) およびRh oキナーゼ (COIL) のマイクロインジェクションの効果について検討した。Rh oキナーゼ (RB) またはRh oキナーゼ (PH) の注入により、LPAによって誘導されるストレスファイバー (図34C、D) およびフォーカル接着 (図34G、H) の形成は阻害された。Rh oキナーゼ (CAT-KD) を注入された細胞の約30%は、LPA存在下においてストレスファイバー (図34A) およびフォーカル接着 (図34E) を形成しなかった。Rh oキナーゼ (COIL) は全く効果がなかった (図34B、F)。Rh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (COIL)、Rh oキナーゼ (RB) あるいはRh oキナーゼ (PH) はいずれも、Rh oキナーゼ (CAT) によって誘導されるストレスファイバーおよびフォーカル接着形成を阻害しなかった。このことにより、Rh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (RB) あるいはRh oキナーゼ (PH) は内在性のRh oキナーゼの機能を阻害するが、外来性に過剰に注入されたRh oキナーゼ (CAT) の機能は阻害しないことが示された。

【0221】実施例18 Rh oキナーゼの欠失変異体をコードするcDNAの導入による細胞形態の変化

スイス3T3細胞はプラスミドの細胞核内への注入には適していないので、本発明者らはMDCK細胞に種々のRh oキナーゼ欠失変異体をコードするcDNAをマイクロインジェクションすることによって、Rh oキナーゼの細胞形態に及ぼす効果について検討した。まず、Rh oキナーゼ (CAT)、Rh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (COIL)、Rh oキナーゼ (RB)、Rh oキナーゼ (PH) を発現するためのpEF-BOS-myc哺乳類発現プラスミドを作製した。MDCK細胞は10%の牛胎児血清を添加した最少必須培地で培養した。2×10³の濃度の細胞を12mmのガラス・カバースリップの上にシードして1日培養した。種々のプラスミドを記載の方法 (A. Ridley et al. Cell 70, 401 (1992)) に従って核内にマイクロインジェクションした。マイクロインジェクション後、細胞を37℃で3時間培養した。アクチンは、Ridley, A. & Hall, A. Cell 70, 389 (1992)およびRidley, A. & Hall, A. EMBO J. 13, 2600 (1994)に記載の方法に従って、TRITCでラベルしたファロイジンで染色した。

【0222】まず、構成的に活性化されたRh o変異体

(Rh o^{V⁶¹¹⁴}) をコードするcDNAをMDCK細胞にマイクロインジェクションしたところ、過去に記載されたように (Nobes, C. & Hall, A. Cell 81, 53 (1995)およびRidley, A. et al. Mol. Cell. Biol. 15, 1110 (1995))、ストレスファイバーの形成 (図35A) およびフォーカル接着 (データ省略) が誘導された。ストレスファイバーおよびフォーカル接着は、Rh oキナーゼ (CAT) をコードするcDNAが注入された細胞 (図35B) において形成された。Rh oキナーゼ (CAT-KD)、構成的に活性化されたPKNまたはMBSをコードするcDNAではこの作用は認められなかった。

【0223】Rh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (RB) またはRh oキナーゼ (PH) をコードするcDNAをRh o^{V⁶¹¹⁴}とともにコインジェクションしたところ、Rh o^{V⁶¹¹⁴}によって誘導されたストレスファイバー (図35C、D、E) およびフォーカル接着 (データ省略) の形成は阻害された。Rh oキナーゼ (CAT-KD) の効果は、Rh oキナーゼ (RB) またはRh oキナーゼ (PH) の効果に比べて低かった。一方、Rh oキナーゼ (COIL) にはこの作用は認められなかった (データ省略)。

【0224】実施例15~18に記載したように、本発明者らはRh oキナーゼ (CAT) の注入によりストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成が誘導されること、そしてRh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (RB) またはRh oキナーゼ (PH) によってLPAまたはRh o^{V⁶¹¹⁴}に誘導されるストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成が阻害されることを示した。これらの事実より、細胞内に存在させたRh oキナーゼ (CAT) はドミナント・アクティブ体として働き、細胞内に存在させたRh oキナーゼ (CAT-KD)、Rh oキナーゼ (RB) およびRh oキナーゼ (PH) はドミナント・ネガティブ体として働くことが明らかとなった。

【0225】Rh oキナーゼ (CAT-KD) は、本発明者らの実験条件では、インビトロにおいてRh oキナーゼのキナーゼ活性に影響を及ぼさなかった (実施例13) が、より高い酵素濃度ではRh oキナーゼと基質との相互作用を阻害する可能性がある。というのは、このような現象が他のキナーゼについて記載されているからである (Kolch, W. et al., Nature 349, 426 (1991))。このことから、Rh oキナーゼ (CAT-KD) は細胞内でRh oキナーゼの機能を阻害した (実施例17~18) にもかかわらず、インビトロにおいてRh oキナーゼのキナーゼ活性に影響を及ぼさなかった (実施例13) のは、用いたRh oキナーゼ (CAT-KD) の濃度が低かったからであると考えられる。

【0226】一方、PH領域は、これを含むタンパク質を特定の細胞内領域に極在させる (localize) と考えら

10

20

30

40

50

れているので、R h o キナーゼ (PH) は細胞内で R h o キナーゼの適切な極在 (localization) を阻害すると考えられる。天然の R h o キナーゼは部分的に細胞間接着部位に存在するにもかかわらず、R h o キナーゼ (CAT) は MDC K 細胞において細胞質領域に存在した (データ省略) という事実は、この可能性を示唆する。

【0227】ところで、R h o キナーゼ (RB) は、R h o タンパク質と R h o キナーゼとの結合を阻害するだけでなく、R h o タンパク質と PKN などの他の R h o 標的タンパク質との結合をも阻害する可能性がある。これに対して、R h o キナーゼ (CAT-KD) および R h o キナーゼ (PH) は、より R h o キナーゼに特異的なインヒビターとして働く可能性がある。

【0228】いずれにしても、スイス 3 T 3 細胞や MDC K 細胞において、R h o キナーゼは R h o の下流で、ストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成を制御すること、および R h o キナーゼ (CAT-KD)、R h o キナーゼ (RB) および R h o キナーゼ (PH) が R h o キナーゼの上記の生理作用を阻害することが示された。

【0229】アクチンフィラメントとミオシンとの結合は、ミオシン軽鎖のリン酸化により促進され、ストレスファイバーの形成の後期段階の1つであると推定されている (J. Kolega et al., Bioimaging 1, 136 (1993)、および K. A. Giuliano & D. L. Taylor, Curr. Opin. Cell Biol. 7, 4 (1995))。R h o はミオシン軽鎖 (MLC) およびミオシン結合サブユニット (MBS) をリン酸化する R h o キナーゼを活性化し、これによりミオ*

配列

```

Met Ser Arg Pro Pro Pro Thr Gly Lys Met Pro Gly Ala Pro Glu Ala
  1              5              10             15
Val Ser Gly Asp Gly Ala Gly Ala Ser Arg Gln Arg Lys Leu Glu Ala
              20              25             30
Leu Ile Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ile Asn Val Glu Ser Leu Leu Asp
              35              40             45
Gly Leu Asn Pro Leu Val Leu Asp Leu Asp Phe Pro Ala Leu Arg Lys
              50              55             60
Asn Lys Asn Ile Asp Asn Phe Leu Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Val Lys
              65              70             75             80
Lys Ile Arg Gly Leu Gln Met Lys Ala Glu Asp Tyr Asp Val Val Lys
              85              90             95
Val Ile Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Gln Leu Val Arg His Lys
              100             105            110
Ala Ser Gln Lys Val Tyr Ala Met Lys Leu Leu Ser Lys Phe Glu Met
              115             120            125
Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ala Phe Phe Trp Glu Glu Arg Asp Ile Met
              130             135            140
Ala Phe Ala Asn Ser Pro Trp Val Val Gln Leu Phe Cys Ala Phe Gln
              145             150            155            160
Asp Asp Lys Tyr Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Asp

```

* シン軽鎖のリン酸化に導くことを本発明者らは示した

(実施例2および実施例5～9)。このリン酸化はアクチンとミオシンの結合およびそれらの収縮性 (contractility) のために必須である (実施例9および実施例12)。事実、本発明において注入された R h o キナーゼ (CAT) により誘導されるアクチンフィラメントにミオシンが結合することを本発明者らは確認した (データ省略)。これらの観察は、R h o によって刺激されるアクチンとミオシンの収縮性がストレスファイバーおよびフォーカル接着の形成を推進するという見解 (M. Chrzanowska-Wodnicka & K. Burridge, J. Cell Biol. 133, 1403-1415 (1996)*) とよく一致する。

【0230】R h o キナーゼはフォーカル接着部位を構成する種々のタンパク質 (ビンキュリン、FAK、パキシリンおよび α -アクチニン) とインテグリンの界合 (assembly) を促進することにより、フォーカル接着形成を誘導すると考えられる。

【0231】

【配列表】

20 配列番号: 1

配列の長さ: 1388

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源:

生物名: ウシ

69												70											
165						170						175											
Leu	Val	Asn	Leu	Met	Ser	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Glu	Lys	Trp	Ala	Lys								
180						185						190											
Phe	Tyr	Thr	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Asp	Ala	Ile	His	Ser	Met								
195						200						205											
Gly	Leu	Ile	His	Arg	Asp	Val	Lys	Pro	Asp	Asn	Met	Leu	Leu	Asp	Lys								
210						215						220											
His	Gly	His	Leu	Lys	Leu	Ala	Asp	Phe	Gly	Thr	Cys	Met	Lys	Met	Asp								
225						230						235											
Glu	Thr	Gly	Met	Val	His	Cys	Asp	Thr	Ala	Val	Gly	Thr	Pro	Asp	Tyr								
245						250						255											
Ile	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Lys	Ser	Gln	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly								
260						265						270											
Arg	Glu	Cys	Asp	Trp	Trp	Ser	Val	Gly	Val	Phe	Leu	Phe	Glu	Met	Leu								
275						280						285											
Val	Gly	Asp	Thr	Pro	Phe	Tyr	Ala	Asp	Ser	Leu	Val	Gly	Thr	Tyr	Ser								
290						295						300											
Lys	Ile	Met	Asp	His	Lys	Asn	Ser	Leu	Cys	Phe	Pro	Glu	Asp	Ala	Glu								
305						310						315											
Ile	Ser	Lys	His	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Cys	Ala	Phe	Leu	Thr	Asp	Arg								
325						330						335											
Glu	Val	Arg	Leu	Gly	Arg	Asn	Gly	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	His	Pro								
340						345						350											
Phe	Phe	Lys	Asn	Asp	Gln	Trp	Asn	Trp	Asp	Asn	Ile	Arg	Glu	Thr	Ala								
355						360						365											
Ala	Pro	Val	Val	Pro	Glu	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Asp	Ser	Ser	Asn	Phe								
370						375						380											
Asp	Asp	Ile	Glu	Asp	Asp	Lys	Gly	Asp	Val	Glu	Thr	Phe	Pro	Ile	Pro								
385						390						395											
Lys	Ala	Phe	Val	Gly	Asn	Gln	Leu	Pro	Phe	Ile	Gly	Phe	Thr	Tyr	Tyr								
405						410						415											
Arg	Glu	Asn	Leu	Leu	Ser	Asp	Ser	Pro	Ser	Cys	Lys	Glu	Asn	Asp									
420						425						430											
Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Lys	Asn	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Ile	Gln	Lys	Lys								
435						440						445											
Leu	Tyr	Thr	Leu	Glu	Glu	His	Leu	Ser	Thr	Glu	Ile	Gln	Ala	Lys	Glu								
450						455						460											
Glu	Leu	Glu	Gln	Lys	Cys	Lys	Ser	Val	Asn	Thr	Arg	Leu	Glu	Lys	Val								
465						470						475											
Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu	Ile	Thr	Leu	Arg	Lys	Asn	Val	Glu	Ser								
485						490						495											
Thr	Leu	Arg	Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	His	Lys	Asn								
500						505						510											
Ala	Glu	Tyr	Gln	Arg	Lys	Ala	Asp	His	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Arg	Asn								
515						520						525											
Leu	Glu	Asn	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys								
530						535						540											
Lys	Arg	Asn	Gln	Asn	Ser	Gln	Ile	Ser	Thr	Glu	Lys	Val	Asn	Gln	Leu								
545						550						555											
Gln	Arg	Gln	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Ala	Leu	Leu	Arg	Thr	Glu	Ser	Asn								

71	565	570	575
Thr Ala Ala Arg Leu Arg Lys Thr Gln Ala Glu Ser Ser Lys Gln Ile			
580	585	590	
Gln Gln Leu Glu Ser Asn Asn Arg Asp Leu Gln Asp Lys Asn Cys Leu			
595	600	605	
Leu Glu Thr Ala Lys Leu Lys Leu Glu Lys Glu Phe Ile Asn Leu Gln			
610	615	620	
Ser Val Leu Glu Ser Glu Arg Arg Asp Arg Thr His Gly Ser Glu Ile			
625	630	635	640
Ile Asn Asp Leu Gln Gly Arg Ile Ser Gly Leu Glu Glu Asp Val Lys			
645	650	655	
Asn Gly Lys Ile Leu Leu Ala Lys Val Glu Leu Glu Lys Arg Gln Leu			
660	665	670	
Gln Glu Arg Phe Thr Asp Leu Glu Lys Glu Lys Asn Asn Met Glu Ile			
675	680	685	
Asp Met Thr Tyr Gln Leu Lys Val Ile Gln Gln Ser Leu Glu Gln Glu			
690	695	700	
Glu Thr Glu His Lys Ala Thr Lys Ala Arg Leu Ala Asp Lys Asn Lys			
705	710	715	720
Ile Tyr Glu Ser Ile Glu Glu Ala Lys Ser Glu Ala Met Lys Glu Met			
725	730	735	
Glu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Arg Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Asn			
740	745	750	
Leu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Arg Cys Ser Ile Leu Asp Cys Asp Leu			
755	760	765	
Lys Gln Ser Gln Gln Lys Ile Asn Glu Leu Leu Lys Gln Lys Asp Val			
770	775	780	
Leu Asn Glu Asp Val Arg Asn Leu Thr Leu Lys Ile Glu Gln Glu Thr			
785	790	795	800
Gln Lys Arg Cys Leu Thr Gln Asn Asp Leu Lys Met Gln Thr Gln Gln			
805	810	815	
Val Asn Thr Leu Lys Met Ser Glu Lys Gln Leu Lys Gln Glu Asn Asn			
820	825	830	
His Leu Leu Glu Met Lys Met Ser Leu Glu Lys Gln Asn Ala Glu Leu			
835	840	845	
Arg Lys Glu Arg Gln Asp Ala Asp Gly Gln Met Lys Glu Leu Gln Asp			
850	855	860	
Gln Leu Glu Ala Glu Gln Tyr Phe Ser Thr Leu Tyr Lys Thr Gln Val			
865	870	875	880
Arg Glu Leu Lys Glu Glu Cys Glu Glu Lys Thr Lys Leu Cys Lys Glu			
885	890	895	
Leu Gln Gln Lys Lys Gln Glu Leu Gln Asp Glu Arg Asp Ser Leu Ala			
900	905	910	
Ala Gln Leu Glu Ile Thr Leu Thr Lys Ala Asp Ser Glu Gln Leu Ala			
915	920	925	
Arg Ser Ile Ala Glu Glu Gln Tyr Ser Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ile			
930	935	940	
Met Lys Glu Leu Glu Ile Lys Glu Met Met Ala Arg His Lys Gln Glu			
945	950	955	960
Leu Thr Glu Lys Asp Ala Thr Ile Ala Ser Leu Glu Glu Thr Asn Arg			

73												74											
965						970						975											
Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Ala	Asn	Leu	Ala	Asn	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu								
980						985						990											
Asn	Asn	Lys	Leu	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Asp								
995						1000						1005											
Glu	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Gln	Phe	Glu	Lys	Gln	Leu								
1010						1015						1020											
Leu	Thr	Glu	Arg	Thr	Leu	Lys	Thr	Gln	Ala	Val	Asn	Lys	Leu	Ala	Glu								
1025						1030						1035						1040					
Ile	Met	Asn	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Lys	Arg	Gly	Asn	Asp	Thr	Asp	Val								
1045						1050						1055											
Arg	Arg	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn	Arg	Lys	Leu	His	Met	Glu	Leu	Lys	Ser								
1060						1065						1070											
Glu	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Gln	Gln	Met	Ile	Lys	Tyr	Gln	Lys	Glu	Leu								
1075						1080						1085											
Asn	Glu	Met	Gln	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Glu	Ser	Gln	Ile	Arg	Ile	Glu								
1090						1095						1100											
Leu	Gln	Met	Thr	Leu	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Ile	Glu	Gln	Leu	Arg								
1105						1110						1115						1120					
Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	His	Ile	Gly	Leu	Asp	Ser	Ser	Ser	Ile	Gly								
1125						1130						1135											
Ser	Gly	Pro	Gly	Asp	Thr	Glu	Ala	Asp	Asp	Gly	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg								
1140						1145						1150											
Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Arg	Asn	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe								
1155						1160						1165											
Gly	Trp	Val	Lys	Lys	Tyr	Val	Ile	Val	Ser	Ser	Lys	Lys	Ile	Leu	Phe								
1170						1175						1180											
Tyr	Asp	Ser	Glu	Gln	Asp	Lys	Glu	Gln	Ser	Asn	Pro	Tyr	Met	Val	Leu								
1185						1190						1195						1200					
Asp	Ile	Asp	Lys	Leu	Phe	His	Val	Arg	Pro	Val	Thr	Gln	Thr	Asp	Val								
1205						1210						1215											
Tyr	Arg	Ala	Asp	Ala	Lys	Glu	Ile	Pro	Arg	Ile	Phe	Gln	Ile	Leu	Tyr								
1220						1225						1230											
Ala	Asn	Glu	Gly	Glu	Ser	Lys	Lys	Glu	Gln	Glu	Phe	Pro	Val	Glu	Pro								
1235						1240						1245											
Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys	His	Lys	Gly	His	Glu	Phe	Ile								
1250						1255						1260											
Pro	Thr	Leu	Tyr	His	Phe	Pro	Thr	Asn	Cys	Glu	Ala	Cys	Met	Lys	Pro								
1265						1270						1275						1280					
Leu	Trp	His	Met	Phe	Lys	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Glu	Cys	Arg	Arg	Cys								
1285						1290						1295											
1300						1305						1310											
Ala	Pro	Cys	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Ser	Ser	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu								
1315						1320						1325											
Leu	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Gln	Gln	Lys	Trp	Val	Ser	Arg	Leu								
1330						1335						1340											
Val	Lys	Lys	Ile	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Pro	Asp	Pro	Phe	Ala	Arg								
1345						1350						1355						1360					
Ser	Ser	Pro	Arg	Thr	Ser	Met	Lys	Ile	Gln	Gln	Asn	Gln	Ser	Ile	Arg								
1365						50 1370						1375											

75

76

Arg Pro Ser Arg Gln Leu Ala Pro Asn Lys Pro Ser
1380 1385

【0232】配列番号：2

配列の長さ：5053

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

* 生物名：ウシ

配列

ATG AGC CGG CCC CCG CCG ACG GGG AAG ATG CCC GGC GCC CCC GAG GCC	48
Met Ser Arg Pro Pro Pro Thr Gly Lys Met Pro Gly Ala Pro Glu Ala	
1 5 10 15	
GTG TCG GGG GAC GGC GCG GGC GCG AGC CGC CAG AGG AAG CTG GAA GCG	96
Val Ser Gly Asp Gly Ala Gly Ala Ser Arg Gln Arg Lys Leu Glu Ala	
20 25 30	
CTG ATC CGA GAC CCT CGT TCG CCC ATC AAC GTG GAG AGC TTG CTG GAT	144
Leu Ile Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ile Asn Val Glu Ser Leu Leu Asp	
35 40 45	
GGC TTA AAT CCT TTG GTC CTT GAT TTG GAT TTT CCT GCT TTG AGG AAA	192
Gly Leu Asn Pro Leu Val Leu Asp Leu Asp Phe Pro Ala Leu Arg Lys	
50 55 60	
AAC AAA AAT ATA GAT AAT TTC TTA AAT AGA TAT GAG AAA ATT GTG AAA	240
Asn Lys Asn Ile Asp Asn Phe Leu Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Val Lys	
65 70 75 80	
AAA ATT AGA GGT TTA CAG ATG AAG GCA GAA GAC TAC GAT GTT GTA AAA	288
Lys Ile Arg Gly Leu Gln Met Lys Ala Glu Asp Tyr Asp Val Val Lys	
85 90 95	
GTT ATC GGA AGA GGT GCT TTT GGT GAA GTC CAG TTG GTT CGT CAT AAG	336
Val Ile Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Gln Leu Val Arg His Lys	
100 105 110	
GCA TCA CAG AAA GTT TAT GCT ATG AAG CTT CTT AGT AAG TTT GAA ATG	384
Ala Ser Gln Lys Val Tyr Ala Met Lys Leu Leu Ser Lys Phe Glu Met	
115 120 125	
ATA AAA AGA TCA GAT TCT GCT TTT TTC TGG GAG GAA AGA GAT ATT ATG	432
Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ala Phe Phe Trp Glu Glu Arg Asp Ile Met	
130 135 140	
GCC TTT GCC AAC AGT CCC TGG GTG GTT CAG CTC TTT TGT GCC TTT CAA	480
Ala Phe Ala Asn Ser Pro Trp Val Val Gln Leu Phe Cys Ala Phe Gln	
145 150 155 160	
GAT GAT AAG TAT CTG TAC ATG GTA ATG GAG TAC ATG CCT GGT GGA GAC	528
Asp Asp Lys Tyr Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Asp	
165 170 175	
CTT GTA AAC CTT ATG AGT AAC TAT GAT GTA CCT GAA AAA TGG GCC AAA	576
Leu Val Asn Leu Met Ser Asn Tyr Asp Val Pro Glu Lys Trp Ala Lys	
180 185 190	
TTT TAT ACT GCT GAA GTT GTT CTT GCT TTG GAT GCC ATA CAC TCC ATG	624
Phe Tyr Thr Ala Glu Val Val Leu Ala Leu Asp Ala Ile His Ser Met	
195 200 205	
GGT TTA ATT CAC AGA GAT GTG AAG CCT GAC AAC ATG CTC TTG GAT AAA	672
Gly Leu Ile His Arg Asp Val Lys Pro Asp Asn Met Leu Leu Asp Lys	
210 215 220	
CAT GGG CAT CTA AAA TTA GCA GAT TGT GGC ACA TGT ATG AAG ATG GAT	720

77	78
His Gly His Leu Lys Leu Ala Asp Phe Gly Thr Cys Met Lys Met Asp	
225 230 235 240	
GAA ACA GGC ATG GTG CAT TGT GAT ACA GCA GTT GGA ACA CCC GAT TAT	768
Glu Thr Gly Met Val His Cys Asp Thr Ala Val Gly Thr Pro Asp Tyr	
245 250 255	
ATA TCA CCC GAG GTC CTG AAA TCA CAA GGG GGT GAT GGT TAC TAT GGG	816
Ile Ser Pro Glu Val Leu Lys Ser Gln Gly Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly	
260 265 270	
CGA GAA TGT GAT TGG TGG TCC GTG GGT GTT TTC CTT TTT GAA ATG CTG	864
Arg Glu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Phe Leu Phe Glu Met Leu	
275 280 285	
GTG GGG GAT ACT CCA TTT TAT GCA GAT TCA CTT GTA GGA ACA TAT AGC	912
Val Gly Asp Thr Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Val Gly Thr Tyr Ser	
290 295 300	
AAA ATT ATG GAT CAT AAA AAC TCA CTA TGT TTC CCT GAA GAT GCA GAA	960
Lys Ile Met Asp His Lys Asn Ser Leu Cys Phe Pro Glu Asp Ala Glu	
305 310 315 320	
ATT TCT AAA CAT GCG AAG AAT CTC ATC TGT GCC TTC TTA ACA GAT AGG	1008
Ile Ser Lys His Ala Lys Asn Leu Ile Cys Ala Phe Leu Thr Asp Arg	
325 330 335	
GAG GTA CGC CTT GGA AGA AAC GGG GTA GAA GAA ATC AAA CAA CAT CCT	1056
Glu Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Lys Gln His Pro	
340 345 350	
TTC TTT AAG AAT GAT CAG TGG AAT TGG GAT AAC ATA AGA GAG ACT GCA	1104
Phe Phe Lys Asn Asp Gln Trp Asn Trp Asp Asn Ile Arg Glu Thr Ala	
355 360 365	
GCT CCT GTG GTA CCT GAA CTC AGC AGT GAC ATA GAC AGC AGC AAT TTT	1152
Ala Pro Val Val Pro Glu Leu Ser Ser Asp Ile Asp Ser Ser Asn Phe	
370 375 380	
GAT GAC ATT GAA GAT GAT AAA GGA GAT GTA GAA ACC TTC CCA ATT CCC	1200
Asp Asp Ile Glu Asp Asp Lys Gly Asp Val Glu Thr Phe Pro Ile Pro	
385 390 395 400	
AAG GCT TTT GTG GGA AAT CAG CTA CCT TTT ATA GGA TTT ACC TAC TAC	1248
Lys Ala Phe Val Gly Asn Gln Leu Pro Phe Ile Gly Phe Thr Tyr Tyr	
405 410 415	
AGA GAA AAT TTG CTA CTA AGT GAC TCT CCA TCT TGT AAA GAA AAT GAC	1296
Arg Glu Asn Leu Leu Leu Ser Asp Ser Pro Ser Cys Lys Glu Asn Asp	
420 425 430	
TCA ATT CAA TCA AGG AAG AAT GAA GAG AGT CAA GAG ATT CAG AAA AAA	1344
Ser Ile Gln Ser Arg Lys Asn Glu Glu Ser Gln Glu Ile Gln Lys Lys	
435 440 445	
CTG TAC ACA TTA GAA GAA CAC CTT AGC ACT GAG ATT CAG GCC AAA GAG	1392
Leu Tyr Thr Leu Glu Glu His Leu Ser Thr Glu Ile Gln Ala Lys Glu	
450 455 460	
GAA CTA GAA CAG AAG TGC AAG TCT GTT AAT ACT CGC TTA GAG AAA GTG	1440
Glu Leu Glu Gln Lys Cys Lys Ser Val Asn Thr Arg Leu Glu Lys Val	
465 470 475 480	
GCA AAG GAG TTA GAA GAA GAG ATT ACC TTA AGG AAA AAT GTG GAA TCA	1488
Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Ile Thr Leu Arg Lys Asn Val Glu Ser	
485 50 490 495	

79	80	
ACA TTA AGA CAA TTA GAA AGA GAA AAA GCA CTT CTT CAG CAC AAA AAT	1536	
Thr Leu Arg Gln Leu Glu Arg Glu Lys Ala Leu Leu Gln His Lys Asn		
500 505 510		
GCA GAA TAT CAG CGG AAA GCT GAT CAT GAA GCA GAC AAG AAG CGA AAT	1584	
Ala Glu Tyr Gln Arg Lys Ala Asp His Glu Ala Asp Lys Lys Arg Asn		
515 520 525		
TTG GAG AAT GAT GTT AAC AGT TTA AAA GAT CAG CTT GAA GAT TTG AAA	1632	
Leu Glu Asn Asp Val Asn Ser Leu Lys Asp Gln Leu Glu Asp Leu Lys		
530 535 540		
AAA AGA AAT CAG AAC TCT CAG ATA TCC ACT GAG AAA GTG AAT CAA CTC	1680	
Lys Arg Asn Gln Asn Ser Gln Ile Ser Thr Glu Lys Val Asn Gln Leu		
545 550 555 560		
CAG AGA CAA CTG GAT GAA ACC AAT GCT TTG CTG CGA ACA GAA TCT GAT	1728	
Gln Arg Gln Leu Asp Glu Thr Asn Ala Leu Leu Arg Thr Glu Ser Asp		
565 570 575		
ACT GCA GCC CGG TTA AGG AAA ACA CAG GCA GAA AGT TCA AAA CAG ATT	1776	
Thr Ala Ala Arg Leu Arg Lys Thr Gln Ala Glu Ser Ser Lys Gln Ile		
580 585 590		
CAG CAG CTG GAA TCT AAC AAT AGA GAT CTA CAA GAC AAA AAT TGC CTG	1824	
Gln Gln Leu Glu Ser Asn Asn Arg Asp Leu Gln Asp Lys Asn Cys Leu		
595 600 605		
CTG GAG ACT GCC AAG TTA AAA CTT GAA AAG GAA TTT ATC AAT CTT CAG	1872	
Leu Glu Thr Ala Lys Leu Lys Leu Glu Lys Glu Phe Ile Asn Leu Gln		
610 615 620		
TCA GTT CTA GAA TCT GAA AGG AGG GAC CGA ACC CAT GGA TCA GAG ATT	1920	
Ser Val Leu Glu Ser Glu Arg Arg Asp Arg Thr His Gly Ser Glu Ile		
625 630 635 640		
ATT AAT GAT TTA CAA GGT AGA ATA TCT GGC CTA GAA GAA GAT GTA AAG	1968	
Ile Asn Asp Leu Gln Gly Arg Ile Ser Gly Leu Glu Glu Asp Val Lys		
645 650 655		
AAT GGT AAA ATC TTA TTA GCA AAA GTA GAG CTG GAG AAG AGA CAA CTA	2016	
Asn Gly Lys Ile Leu Leu Ala Lys Val Glu Leu Glu Lys Arg Gln Leu		
660 665 670		
CAG GAG AGA TTT ACT GAT TTG GAA AAG GAA AAG AAC AAC ATG GAA ATA	2064	
Gln Glu Arg Phe Thr Asp Leu Glu Lys Glu Lys Asn Asn Met Glu Ile		
675 680 685		
GAT ATG ACA TAC CAA CTA AAA GTC ATA CAG CAA AGT TTA GAA CAA GAA	2112	
Asp Met Thr Tyr Gln Leu Lys Val Ile Gln Gln Ser Leu Glu Gln Glu		
690 695 700		
GAA ACT GAA CAT AAG GCT ACA AAA GCA CGG CTT GCA GAT AAA AAC AAG	2160	
Glu Thr Glu His Lys Ala Thr Lys Ala Arg Leu Ala Asp Lys Asn Lys		
705 710 715 720		
ATT TAT GAA TCC ATT GAA GAA GCT AAA TCA GAA GCC ATG AAA GAA ATG	2208	
Ile Tyr Glu Ser Ile Glu Glu Ala Lys Ser Glu Ala Met Lys Glu Met		
725 730 735		
GAG AAA AAG CTC TCG GAG GAA AGA ACT TTA AAA CAG AAA GTA GAG AAC	2256	
Glu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Arg Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Asn		
740 745 750		
TTG TTG CTG GAG GCT GAG AAA AGA TGC TCT ATA TTA GAC TGT GAC CTC	2304	
Leu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Arg Ser Ile Leu Asp Cys Asp Leu		

81	82
755	760
AAA CAG TCA CAG CAG AAA ATA AAT GAA CTC CTC AAA CAG AAA GAT GTG	2352
Lys Gln Ser Gln Gln Lys Ile Asn Glu Leu Leu Lys Gln Lys Asp Val	
770	775
CTA AAT GAG GAT GTT AGA AAC TTG ACA TTA AAA ATA GAA CAG GAA ACT	2400
Leu Asn Glu Asp Val Arg Asn Leu Thr Leu Lys Ile Glu Gln Glu Thr	
785	790
CAG AAG CGC TGC CTT ACA CAA AAT GAC TTG AAG ATG CAA ACA CAG CAA	2448
805	810
GTT AAC ACA CTA AAA ATG TCA GAA AAG CAG TTA AAG CAA GAG AAT AAT	2496
Val Asn Thr Leu Lys Met Ser Glu Lys Gln Leu Lys Gln Glu Asn Asn	
820	825
CAT CTC CTA GAA ATG AAA ATG AGC TTG GAA AAA CAG AAT GCT GAA CTT	2544
His Leu Leu Glu Met Lys Met Ser Leu Glu Lys Gln Asn Ala Glu Leu	
835	840
CGA AAA GAA CGT CAA GAT GCA GAT GGA CAG ATG AAA GAG CTC CAG GAT	2592
Arg Lys Glu Arg Gln Asp Ala Asp Gly Gln Met Lys Glu Leu Gln Asp	
850	855
CAG CTT GAA GCA GAG CAG TAT TTC TCA ACC CTC TAT AAA ACA CAG GTT	2640
Gln Leu Glu Ala Glu Gln Tyr Phe Ser Thr Leu Tyr Lys Thr Gln Val	
865	870
AGG GAA CTT AAG GAA GAA TGT GAA GAA AAG ACC AAA CTT TGT AAA GAA	2688
Arg Glu Leu Lys Glu Glu Cys Glu Glu Lys Thr Lys Leu Cys Lys Glu	
885	890
TTA CAG CAG AAG AAG CAG GAA TTA CAG GAT GAA AGG GAC TCC TTG GCT	2736
Leu Gln Gln Lys Lys Gln Glu Leu Gln Asp Glu Arg Asp Ser Leu Ala	
900	905
GCT CAA CTG GAG ATT ACC TTA ACC AAA GCA GAT TCT GAG CAA CTG GCT	2784
Ala Gln Leu Glu Ile Thr Leu Thr Lys Ala Asp Ser Glu Gln Leu Ala	
915	920
CGT TCA ATT GCT GAG GAA CAG TAT TCT GAT TTG GAA AAA GAG AAG ATC	2832
Arg Ser Ile Ala Glu Glu Gln Tyr Ser Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ile	
930	935
ATG AAA GAG CTG GAG ATC AAA GAG ATG ATG GCT CGA CAC AAA CAG GAA	2880
Met Lys Glu Leu Glu Ile Lys Glu Met Met Ala Arg His Lys Gln Glu	
945	950
CTC ACC GAA AAA GAT GCT ACT ATT GCG TCT CTT GAA GAA ACT AAT AGG	2928
Leu Thr Glu Lys Asp Ala Thr Ile Ala Ser Leu Glu Glu Thr Asn Arg	
965	970
ACA CTA ACT AGT GAT GTT GCC AAT CTT GCA AAT GAG AAA GAA GAA TTA	2976
Thr Leu Thr Ser Asp Val Ala Asn Leu Ala Asn Glu Lys Glu Glu Leu	
980	985
AAT AAC AAA CTG AAG GAA GCC CAA GAG CAA CTA TCA AGG TTG AAA GAT	3024
Asn Asn Lys Leu Lys Glu Ala Gln Glu Gln Leu Ser Arg Leu Lys Asp	
995	1000
GAA GAA ATA AGT GCA GCA GCT ATT AAA GCA CAA TTT GAG AAG CAG CTG	3072
Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gln Phe Glu Lys Gln Leu	
1010	1015
TTA ACA GAG AGG ACA CTC AAA ACT CAA GCT GTG AAT AAG TTG GCT GAG	3120
Leu Thr Glu Arg Thr Leu Lys Thr Gln Ala Val Asn Lys Leu Ala Glu	

83	84
1025	1040
ATC ATG AAT CGA AAG GAA CCT GTT AAG CGT GGT AAT GAC ACA GAT GTG	3168
Ile Met Asn Arg Lys Glu Pro Val Lys Arg Gly Asn Asp Thr Asp Val	
1030	1050
CGG AGA AAA GAA AAG GAG AAT AGA AAG CTA CAT ATG GAA CTT AAA TCT	3216
Arg Arg Lys Glu Lys Glu Asn Arg Lys Leu His Met Glu Leu Lys Ser	
1045	1070
GAA CGC GAA AAA CTG ACC CAG CAG ATG ATC AAG TAT CAG AAA GAA CTG	3264
Glu Arg Glu Lys Leu Thr Gln Gln Met Ile Lys Tyr Gln Lys Glu Leu	
1060	1085
AAT GAA ATG CAG GCT CAA ATA GCT GAA GAG AGT CAG ATT CGA ATT GAA	3312
Asn Glu Met Gln Ala Gln Ile Ala Glu Glu Ser Gln Ile Arg Ile Glu	
1090	1100
CTA CAG ATG ACA CTG GAC AGT AAG GAC AGT GAC ATT GAG CAG CTG CGC	3360
Leu Gln Met Thr Leu Asp Ser Lys Asp Ser Asp Ile Glu Gln Leu Arg	
1105	1115
TCC CAG CTC CAG GCC TTG CAC ATT GGT TTG GAT AGT TCC AGT ATA GGC	3408
Ser Gln Leu Gln Ala Leu His Ile Gly Leu Asp Ser Ser Ser Ile Gly	
1125	1135
AGT GGA CCA GGG GAT ACT GAA GCT GAT GAC GGT TTT CCA GAA TCA AGA	3456
Ser Gly Pro Gly Asp Thr Glu Ala Asp Asp Gly Phe Pro Glu Ser Arg	
1140	1150
CTA GAA GGA TGG CTT TCA TTG CCT GTG CGA AAC AAC ACT AAG AAA TTT	3504
Leu Glu Gly Trp Leu Ser Leu Pro Val Arg Asn Asn Thr Lys Lys Phe	
1155	1165
GGA TGG GTT AAA AAG TAT GTG ATT GTA AGC AGT AAG AAG ATC CTT TTC	3552
Gly Trp Val Lys Lys Tyr Val Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Leu Phe	
1170	1180
TAT GAC AGT GAG CAA GAT AAA GAA CAA TCT AAT CCT TAC ATG GTT TTA	3600
Tyr Asp Ser Glu Gln Asp Lys Glu Gln Ser Asn Pro Tyr Met Val Leu	
1185	1195
GAT ATA GAC AAG TTA TTT CAT GTC CGA CCA GTT ACA CAG ACA GAT GTA	3648
Asp Ile Asp Lys Leu Phe His Val Arg Pro Val Thr Gln Thr Asp Val	
1205	1215
TAT AGA GCA GAT GCT AAA GAA ATT CCA AGG ATA TTC CAG ATT CTG TAT	3696
Tyr Arg Ala Asp Ala Lys Glu Ile Pro Arg Ile Phe Gln Ile Leu Tyr	
1220	1230
GCC AAC GAA GGA GAA AGT AAG AAG GAA CAA GAA TTT CCA GTG GAG CCA	3744
Ala Asn Glu Gly Glu Ser Lys Lys Glu Gln Glu Phe Pro Val Glu Pro	
1235	1245
GTG GGA GAA AAA TCA AAT TAT ATT TGC CAC AAG GGA CAT GAA TTT ATT	3792
Val Gly Glu Lys Ser Asn Tyr Ile Cys His Lys Gly His Glu Phe Ile	
1250	1260
CCT ACT CTG TAT CAT TTC CCA ACC AAC TGT GAG GCA TGT ATG AAG CCA	3840
Pro Thr Leu Tyr His Phe Pro Thr Asn Cys Glu Ala Cys Met Lys Pro	
1265	1275
TTG TGG CAC ATG TTT AAA CCC CCT CCT GCT TTA GAG TGC CGT CGC TGT	3888
Leu Trp His Met Phe Lys Pro Pro Pro Ala Leu Glu Cys Arg Arg Cys	
1285	1295
CAT ATT AAA TGT CAT AAA GAT CAC AAG GAC AAA AAG GAG GAA ATT ATA	3936

85	86	
His Ile Lys Cys His Lys Asp His Met Asp Lys Lys Glu Glu Ile Ile		
1300	1305	1310
GCG CCT TGC AAA GTG TAT TAT GAT ATT TCA TCG GCA AAG AAT CTA TTG		3984
Ala Pro Cys Lys Val Tyr Tyr Asp Ile Ser Ser Ala Lys Asn Leu Leu		
1315	1320	1325
TTA TTG GCA AAT TCT ACA GAA GAG CAG CAA AAG TGG GTT ACT CGG TTA		4032
Leu Leu Ala Asn Ser Thr Glu Glu Gln Gln Lys Trp Val Ser Arg Leu		
1330	1335	1340
GTG AAA AAA ATA CCT AAA AAG CCT CCA GCT CCA GAC CCT TTT GCA CGG		4080
Val Lys Lys Ile Pro Lys Lys Pro Pro Ala Pro Asp Pro Phe Ala Arg		
1345	1350	1355
TCA TCT CCT AGA ACG TCA ATG AAA ATA CAA CAA AAC CAG TCT ATT CGA		4128
Ser Ser Pro Arg Thr Ser Met Lys Ile Gln Gln Asn Gln Ser Ile Arg		
1365	1370	1375
CGG CCA AGT CGA CAA CTT GCT CCA AAC AAA CCA AGC		4164
Arg Pro Ser Arg Gln Leu Ala Pro Asn Lys Pro Ser		
1380	1385	
TAAGTGCCTT CTGTGAATGC AGTCATTATT TAAGGTGATC ATATTCTTCT AGTTGAAACA		4224
AGACTGAAAT ATGATGGCCC AAAATTTATT AAAAAGTTAT ATTTCTCTGA GAGACTAATA		4284
CACATATATA TTCCCTCTAT TCCTGCAATA TAAATTCTAA ATCTTGAATA GGTTTCTGG		4344
GCTCCTTTGG AGCAACAAGT TGAACCAACA GTGATTGGTT AATAGAATAA GAATATCATG		4404
TGCAACTCTT CCAGACTTAT TCCATAAAGC TCTCCTAGCA TCACTCACAC TACATTGCAT		4464
AAAGGATTTA GAAGAGTTAC AGAAATCATC TTTTCAGCTT CAACAGAGAG ATTTACCAG		4524
CACATTTGCC AGAAGAATCT GGGAATGGAT TCCACTACAG TGATAGAGAC TGCGTCTTTA		4584
AGAAGTGACC ATTGTAGTGT GTGTGTGAAC ACACACACAC ACATACACAC ACACACACAC		4644
ACACACATAG TACTGTAATA CTGCAAGAGG GTTTTTTAAC TTCCCACTTT ATTTTTTTAT		4704
AAACATTAAT CAGATATCAT TACTTACTGC AGTTGTAAGT ATGCACTTGT ATAAAGCCAT		4764
AATGTTGGAG TTTATATCAC TCATTGTGTG TACCTGCTGG AAGCTGCATG TTCATGTTTA		4824
AGCAGTTATT GTAACAAGAA GTTTGAAGTT AATTATATCA GTTTCTTAAT GCTTTGTAAT		4884
AGGCAATTTT ACCCATTTTG AATGCCTTAA TTTAATTTTT TTCAAGGTAT CCACCTTTTC		4944
CTGTATTTAA AACAAAAAAA AAAGTATTTG CCAGCTCTTA GGATGCAAAT TTGCTTTGCA		5004
GAAGAAAATT AGTGCATAT TTTTACACAT AGTAGTTATC ATTGTCGGC		5053

【0233】配列番号：3

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：

* 生物名：ウシ

配列

Cys Lys Arg Gln Leu Gln Glu Arg Phe Thr Asp Leu Glu Lys

1

5

10

【0234】配列番号：4

配列の長さ：1388

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：

※ 生物名：ヒト

配列

Met Ser Arg Pro Pro Pro Thr Gly Lys Met Pro Gly Ala Pro Glu Thr

1

5

10

15

Ala Pro Gly Asp Gly Ala Gly Ala Ser Arg Gln Arg Lys Leu Glu Ala

20

25

30

Leu Ile Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ile Asn Val Glu Ser Leu Leu Asp

35

40 50

45

87 88
 Gly Leu Asn Ser Leu Val Leu Asp Leu Asp Phe Pro Ala Leu Arg Lys
 50 55 60
 Asn Lys Asn Ile Asp Asn Phe Leu Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Val Lys
 65 70 75 80
 Lys Ile Lys Gly Leu Gln Met Lys Ala Glu Asp Tyr Asp Val Val Lys
 85 90 95
 Val Ile Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Gln Leu Val Arg His Lys
 100 105 110
 Ala Ser Gln Lys Val Tyr Ala Met Lys Leu Leu Ser Lys Phe Glu Met
 115 120 125
 Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ala Phe Phe Trp Glu Glu Arg Asp Ile Met
 130 135 140
 Ala Phe Ala Asn Ser Pro Trp Val Val Gln Leu Phe Tyr Ala Phe Gln
 145 150 155 160
 Asp Asp Arg Tyr Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Asp
 165 170 175
 Leu Val Asn Leu Met Ser Asn Tyr Asp Val Pro Glu Lys Trp Ala Lys
 180 185 190
 Phe Tyr Thr Ala Glu Val Val Leu Ala Leu Asp Ala Ile His Ser Met
 195 200 205
 Gly Leu Ile His Arg Asp Val Lys Pro Asp Asn Met Leu Leu Asp Lys
 210 215 220
 His Gly His Leu Lys Leu Ala Asp Phe Gly Thr Cys Met Lys Met Asp
 225 230 235 240
 Glu Thr Gly Met Val His Cys Asp Thr Ala Val Gly Thr Pro Asp Tyr
 245 250 255
 Ile Ser Pro Glu Val Leu Lys Ser Gln Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Gly
 260 265 270
 Arg Glu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Phe Leu Tyr Glu Met Leu
 275 280 285
 Val Gly Asp Thr Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Val Gly Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Lys Ile Met Asp His Lys Asn Ser Leu Cys Phe Pro Glu Asp Ala Glu
 305 310 315 320
 Ile Ser Lys His Ala Lys Asn Leu Ile Cys Ala Phe Leu Thr Asp Arg
 325 330 335
 Glu Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Arg Gln His Pro
 340 345 350
 Phe Phe Lys Asn Asp Gln Trp His Trp Asp Asn Ile Arg Glu Thr Ala
 355 360 365
 Ala Pro Val Val Pro Glu Leu Ser Ser Asp Ile Asp Ser Ser Asn Phe
 370 375 380
 Asp Asp Ile Glu Asp Asp Lys Gly Asp Val Glu Thr Phe Pro Ile Pro
 385 390 395 400
 Lys Ala Phe Val Gly Asn Gln Leu Pro Phe Ile Gly Phe Thr Tyr Tyr
 405 410 415
 Arg Glu Asn Leu Leu Leu Ser Asp Ser Pro Ser Cys Arg Glu Asn Asp
 420 425 430
 Ser Ile Gln Ser Arg Lys Asn Glu Glu Ser Gln Glu Ile Gln Lys Lys
 435 440 50 445

89 90
 Leu Tyr Thr Leu Glu Glu His Leu Ser Asn Glu Met Gln Ala Lys Glu
 450 455 460
 Glu Leu Glu Gln Lys Cys Lys Ser Val Asn Thr Arg Leu Glu Lys Thr
 465 470 475 480
 Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Ile Thr Leu Arg Lys Ser Val Glu Ser
 485 490 495
 Ala Leu Arg Gln Leu Glu Arg Glu Lys Ala Leu Leu Gln His Lys Asn
 500 505 510
 Ala Glu Tyr Gln Arg Lys Ala Asp His Glu Ala Asp Lys Lys Arg Asn
 515 520 525
 Leu Glu Asn Asp Val Asn Ser Leu Lys Asp Gln Leu Glu Asp Leu Lys
 530 535 540
 Lys Arg Asn Gln Asn Ser Gln Ile Ser Thr Glu Lys Val Asn Gln Leu
 545 550 555 560
 Gln Arg Gln Leu Asp Glu Thr Asn Ala Leu Leu Arg Thr Glu Ser Asp
 565 570 575
 Thr Ala Ala Arg Leu Arg Lys Thr Gln Ala Glu Ser Ser Lys Gln Ile
 580 585 590
 Gln Gln Leu Glu Ser Asn Asn Arg Asp Leu Gln Asp Lys Asn Cys Leu
 595 600 605
 Leu Glu Thr Ala Lys Leu Lys Leu Glu Lys Glu Phe Ile Asn Leu Gln
 610 615 620
 Ser Ala Leu Glu Ser Glu Arg Arg Asp Arg Thr His Gly Ser Glu Ile
 625 630 635 640
 Ile Asn Asp Leu Gln Gly Arg Ile Cys Gly Leu Glu Glu Asp Leu Lys
 645 650 655
 Asn Gly Lys Ile Leu Leu Ala Lys Val Glu Leu Glu Lys Arg Gln Leu
 660 665 670
 Gln Glu Arg Phe Thr Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ser Asn Met Glu Ile
 675 680 685
 Asp Met Thr Tyr Gln Leu Lys Val Ile Gln Gln Ser Leu Glu Gln Glu
 690 695 700
 Glu Ala Glu His Lys Ala Thr Lys Ala Arg Leu Ala Asp Lys Asn Lys
 705 710 715 720
 Ile Tyr Glu Ser Ile Glu Glu Ala Lys Ser Glu Ala Met Lys Glu Met
 725 730 735
 Glu Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Asn
 740 745 750
 Leu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Arg Cys Ser Leu Leu Asp Cys Asp Leu
 755 760 765
 Lys Gln Ser Gln Gln Lys Ile Asn Glu Leu Leu Lys Gln Lys Asp Val
 770 775 780
 Leu Asn Glu Asp Val Arg Asn Leu Thr Leu Lys Ile Glu Gln Glu Thr
 785 790 795 800
 Gln Lys Arg Cys Leu Thr Gln Asn Asp Leu Lys Met Gln Thr Gln Gln
 805 810 815
 Val Asn Thr Leu Lys Met Ser Glu Lys Gln Leu Lys Gln Glu Asn Asn
 820 825 830
 His Leu Met Glu Met Lys Met Asn Leu Glu Lys Gln Asn Ala Glu Leu
 835 840 50 845

91		92
Arg Lys Glu Arg Gln Asp Ala Asp Gly Gln Met Lys Glu Leu Gln Asp		
850	855	860
Gln Leu Glu Ala Glu Gln Tyr Phe Ser Thr Leu Tyr Lys Thr Gln Val		
865	870	875
Arg Glu Leu Lys Glu Glu Cys Glu Glu Lys Thr Lys Leu Gly Lys Glu		
	885	890
		895
Leu Gln Gln Lys Lys Gln Glu Leu Gln Asp Glu Arg Asp Ser Leu Ala		
	900	905
		910
Ala Gln Leu Glu Ile Thr Leu Thr Lys Ala Asp Ser Glu Gln Leu Ala		
	915	920
		925
Arg Ser Ile Ala Glu Glu Gln Tyr Ser Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ile		
930	935	940
Met Lys Glu Leu Glu Ile Lys Glu Met Met Ala Arg His Lys Gln Glu		
945	950	955
		960
Leu Thr Glu Lys Asp Ala Thr Ile Ala Ser Leu Glu Glu Thr Asn Arg		
	965	970
		975
Thr Leu Thr Ser Asp Val Ala Asn Leu Ala Asn Glu Lys Glu Glu Leu		
	980	985
		990
Asn Asn Lys Leu Lys Asp Val Gln Glu Gln Leu Ser Arg Leu Lys Asp		
	995	1000
		1005
Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gln Phe Glu Lys Gln Leu		
1010	1015	1020
Leu Thr Glu Arg Thr Leu Lys Thr Gln Ala Val Asn Lys Leu Ala Glu		
1025	1030	1035
		1040
Ile Met Asn Arg Lys Glu Pro Val Lys Arg Gly Asn Asp Thr Asp Val		
	1045	1050
		1055
Arg Arg Lys Glu Lys Glu Asn Arg Lys Leu His Met Glu Leu Lys Ser		
	1060	1065
		1070
Glu Arg Glu Lys Leu Thr Gln Gln Met Ile Lys Tyr Gln Lys Glu Leu		
1075	1080	1085
Asn Glu Met Gln Ala Gln Ile Ala Glu Glu Ser Gln Ile Arg Ile Glu		
1090	1095	1100
Leu Gln Met Thr Leu Asp Ser Lys Asp Ser Asp Ile Glu Gln Leu Arg		
1105	1110	1115
		1120
Ser Gln Leu Gln Ala Leu His Ile Gly Leu Asp Ser Ser Ser Ile Gly		
	1125	1130
		1135
Ser Gly Pro Gly Asp Ala Glu Ala Asp Asp Gly Phe Pro Glu Ser Arg		
	1140	1145
		1150
Leu Glu Gly Trp Leu Ser Leu Pro Val Arg Asn Asn Thr Lys Lys Phe		
1155	1160	1165
Gly Trp Val Lys Lys Tyr Val Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Leu Phe		
1170	1175	1180
Tyr Asp Ser Glu Gln Asp Lys Glu Gln Ser Asn Pro Tyr Met Val Leu		
1185	1190	1195
		1200
Asp Ile Asp Lys Leu Phe His Val Arg Pro Val Thr Gln Thr Asp Val		
	1205	1210
		1215
Tyr Arg Ala Asp Ala Lys Glu Ile Pro Arg Ile Phe Gln Ile Leu Tyr		
	1220	1225
		1230
Ala Asn Glu Gly Glu Ser Lys Lys Glu Gln Glu Phe Pro Val Glu Pro		
1235	1240	50
		1245

93	94
Val Gly Glu Lys Ser Asn Tyr Ile Cys His Lys Gly His Glu Phe Ile	
1250	1255 1260
Pro Thr Leu Tyr His Phe Pro Thr Asn Cys Glu Ala Cys Met Lys Pro	
1265	1270 1275 1280
Leu Trp His Met Phe Lys Pro Pro Pro Ala Leu Glu Cys Arg Arg Cys	
1285	1290 1295
His Ile Lys Cys His Lys Asp His Met Asp Lys Lys Glu Glu Ile Ile	
1300	1305 1310
Ala Pro Cys Lys Val Tyr Tyr Asp Ile Ser Thr Ala Lys Asn Leu Leu	
1315	1320 1325
Leu Leu Ala Asn Ser Thr Glu Glu Gln Gln Lys Trp Val Ser Arg Leu	
1330	1335 1340
Val Lys Lys Ile Pro Lys Lys Pro Pro Ala Pro Asp Pro Phe Ala Arg	
1345	1350 1355 1360
Ser Ser Pro Arg Thr Ser Met Lys Ile Gln Gln Asn Gln Ser Ile Arg	
1365	1370 1375
Arg Pro Ser Arg Gln Leu Ala Pro Asn Lys Pro Ser	
1380	1385

【0235】配列番号：5

配列の長さ：4363

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：cDNA

起源：

* 生物名：ヒト

配列

ATG AGC CGG CCC CCG CCG ACG GGG AAA ATG CCC GGC GCC CCC GAG ACC	48
Met Ser Arg Pro Pro Pro Thr Gly Lys Met Pro Gly Ala Pro Glu Thr	
1 5 10 15	
GCG CCG GGG GAC GGG GCA GGC GCG AGC CGC CAG AGG AAG CTG GAG GCG	96
Ala Pro Gly Asp Gly Ala Gly Ala Ser Arg Gln Arg Lys Leu Glu Ala	
20 25 30	
CTG ATC CGA GAC CCT CGC TCC CCC ATC AAC GTG GAG AGC TTG CTG GAT	144
Leu Ile Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ile Asn Val Glu Ser Leu Leu Asp	
35 40 45	
GGC TTA AAT TCC TTG GTC CTT GAT TTA GAT TTT CCT GCT TTG AGG AAA	192
Gly Leu Asn Ser Leu Val Leu Asp Leu Asp Phe Pro Ala Leu Arg Lys	
50 55 60	
AAC AAG AAC ATA GAT AAT TTC TTA AAT AGA TAT GAG AAA ATT GTG AAA	240
Asn Lys Asn Ile Asp Asn Phe Leu Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Val Lys	
65 70 75 80	
AAA ATC AAA GGT CTA CAG ATG AAG GCA GAA GAC TAT GAT GTT GTA AAA	288
Lys Ile Lys Gly Leu Gln Met Lys Ala Glu Asp Tyr Asp Val Val Lys	
85 90 95	
GTT ATT GGA AGA GGT GCT TTT GGT GAA GTG CAG TTG GTT CGT CAC AAG	336
Val Ile Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Gln Leu Val Arg His Lys	
100 105 110	
GCA TCG CAG AAG GTT TAT GCT ATG AAG CTT CTT AGT AAG TTT GAA ATG	384
Ala Ser Gln Lys Val Tyr Ala Met Lys Leu Leu Ser Lys Phe Glu Met	
115 120 125	
ATA AAA AGA TCA GAT TCT GCC TTT TTT TGG GAA GAA AGA GAT ATT ATG	432
Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ala Phe Phe Trp Glu Glu Arg Asp Ile Met	
130 135 50 140	

95	96	
GCC TTT GCC AAT AGC CCC TGG GTG GTT CAG CTT TTT TAT GCC TTT CAA	480	
Ala Phe Ala Asn Ser Pro Trp Val Val Gln Leu Phe Tyr Ala Phe Gln		
145 150 155 160		
GAT GAT AGG TAT CTG TAC ATG GTA ATG GAG TAC ATG CCT GGT GGA GAC	528	
Asp Asp Arg Tyr Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Asp		
165 170 175		
CTT GTA AAC CTT ATG AGT AAT TAT GAT GTG CCT GAA AAA TGG GCC AAA	576	
Leu Val Asn Leu Met Ser Asn Tyr Asp Val Pro Glu Lys Trp Ala Lys		
180 185 190		
TTT TAC ACT GCT GAA GTT GTT CTT GCT CTG GAT GCA ATA CAC TCC ATG	624	
Phe Tyr Thr Ala Glu Val Val Leu Ala Leu Asp Ala Ile His Ser Met		
195 200 205		
GGT TTA ATA CAC AGA GAT GTG AAG CCT GAC AAC ATG CTC TTG GAT AAA	672	
Gly Leu Ile His Arg Asp Val Lys Pro Asp Asn Met Leu Leu Asp Lys		
210 215 220		
CAT GGA CAT CTA AAA TTA GCA GAT TTT GGC ACG TGT ATG AAG ATG GAT	720	
His Gly His Leu Lys Leu Ala Asp Phe Gly Thr Cys Met Lys Met Asp		
225 230 235 240		
GAA ACA GGC ATG GTA CAT TGT GAT ACA GCA GTT GGA ACA CCG GAT TAT	768	
Glu Thr Gly Met Val His Cys Asp Thr Ala Val Gly Thr Pro Asp Tyr		
245 250 255		
ATA TCA CCT GAG GTT CTG AAA TCA CAA GGG GGT GAT GGT TTC TAT GGG	816	
Ile Ser Pro Glu Val Leu Lys Ser Gln Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Gly		
260 265 270		
CGA GAA TGT GAT TGG TGG TCT GTA GGT GTT TTC CTT TAT GAG ATG CTA	864	
Arg Glu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Phe Leu Tyr Glu Met Leu		
275 280 285		
GTG GGG GAT ACT CCA TTT TAT GCG GAT TCA CTT GTA GGA ACA TAT AGC	912	
Val Gly Asp Thr Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Val Gly Thr Tyr Ser		
290 295 300		
AAA ATT ATG GAT CAT AAG AAT TCA CTG TGT TTC CCT GAA GAT GCA GAA	960	
Lys Ile Met Asp His Lys Asn Ser Leu Cys Phe Pro Glu Asp Ala Glu		
305 310 315 320		
ATT TCC AAA CAT GCA AAG AAT CTC ATC TGT GCT TTC TTA ACA GAT AGG	1008	
Ile Ser Lys His Ala Lys Asn Leu Ile Cys Ala Phe Leu Thr Asp Arg		
325 330 335		
GAG GTA CGA CTT GGG AGA AAT GGG GTG GAA GAA ATC AGA CAG CAT CCT	1056	
Glu Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Arg Gln His Pro		
340 345 350		
TTC TTT AAG AAT GAT CAG TGG CAT TGG GAT AAC ATA AGA GAA ACG GCA	1104	
Phe Phe Lys Asn Asp Gln Trp His Trp Asp Asn Ile Arg Glu Thr Ala		
355 360 365		
GCT CCT GTA GTA CCT GAA CTC AGC AGT GAC ATA GAC AGC AGC AAT TTC	1152	
Ala Pro Val Val Pro Glu Leu Ser Ser Asp Ile Asp Ser Ser Asn Phe		
370 375 380		
GAT GAC ATT GAA GAT GAC AAA GGA GAT GTA GAA ACC TTC CCA ATT CCT	1200	
Asp Asp Ile Glu Asp Asp Lys Gly Asp Val Glu Thr Phe Pro Ile Pro		
385 390 395 400		
AAA GCT TTT GTT GGA AAT CAG CTG CCT TTC ATC GGA TTT ACC TAC TAT	1248	
Lys Ala Phe Val Gly Asn Gln Leu Phe Ile Gly Phe Thr Tyr Tyr		

97	405	410	415	98
AGA GAA AAT TTA TTA TTA AGT GAC TCT CCA TCT TGT AGA GAA AAT GAT				1296
Arg Glu Asn Leu Leu Leu Ser Asp Ser Pro Ser Cys Arg Glu Asn Asp				
420	425	430		
TCC ATA CAA TCA AGG AAA AAT GAA GAA AGT CAA GAG ATT CAG AAA AAA				1344
Ser Ile Gln Ser Arg Lys Asn Glu Glu Ser Gln Glu Ile Gln Lys Lys				
435	440	445		
CTG TAT ACA TTA GAA GAA CAT CTT AGC AAT GAG ATG CAA GCC AAA GAG				1392
Leu Tyr Thr Leu Glu Glu His Leu Ser Asn Glu Met Gln Ala Lys Glu				
450	455	460		
GAA CTG GAA CAG AAG TGC AAA TCT GTT AAT ACT CGC CTA GAA AAA ACA				1440
Glu Leu Glu Gln Lys Cys Lys Ser Val Asn Thr Arg Leu Glu Lys Thr				
465	470	475	480	
GCA AAG GAG CTA GAA GAG GAG ATT ACC TTA CGG AAA AGT GTG GAA TCA				1488
Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Ile Thr Leu Arg Lys Ser Val Glu Ser				
485	490	495		
GCA TTA AGA CAG TTA GAA AGA GAA AAG GCG CTT CTT CAG CAC AAA AAT				1536
Ala Leu Arg Gln Leu Glu Arg Glu Lys Ala Leu Leu Gln His Lys Asn				
500	505	510		
GCA GAA TAT CAG AGG AAA GCT GAT CAT GAA GCA GAC AAA AAA CGA AAT				1584
Ala Glu Tyr Gln Arg Lys Ala Asp His Glu Ala Asp Lys Lys Arg Asn				
515	520	525		
TTG GAA AAT GAT GTT AAC AGC TTA AAA GAT CAA CTT GAA GAT TTG AAA				1632
Leu Glu Asn Asp Val Asn Ser Leu Lys Asp Gln Leu Glu Asp Leu Lys				
530	535	540		
AAA AGA AAT CAA AAC TCT CAA ATA TCC ACT GAG AAA GTG AAT CAA CTC				1680
Lys Arg Asn Gln Asn Ser Gln Ile Ser Thr Glu Lys Val Asn Gln Leu				
545	550	555	560	
CAG AGA CAA CTG GAT GAA ACC AAT GCT TTA CTG CGA ACA GAG TCT GAT				1728
Gln Arg Gln Leu Asp Glu Thr Asn Ala Leu Leu Arg Thr Glu Ser Asp				
565	570	575		
ACT GCA GCC CGG TTA AGG AAA ACC CAG GCA GAA AGT TCA AAA CAG ATT				1776
Thr Ala Ala Arg Leu Arg Lys Thr Gln Ala Glu Ser Ser Lys Gln Ile				
580	585	590		
CAG CAG CTG GAA TCT AAC AAT AGA GAT CTA CAA GAT AAA AAC TGC CTG				1824
Gln Gln Leu Glu Ser Asn Asn Arg Asp Leu Gln Asp Lys Asn Cys Leu				
595	600	605		
CTG GAG ACT GCC AAG TTA AAA CTT GAA AAG GAA TTT ATC AAT CTT CAG				1872
Leu Glu Thr Ala Lys Leu Lys Leu Glu Lys Glu Phe Ile Asn Leu Gln				
610	615	620		
TCA GCT CTA GAA TCT GAA AGG AGG GAT CGA ACC CAT GGA TCA GAG ATA				1920
Ser Ala Leu Glu Ser Glu Arg Arg Asp Arg Thr His Gly Ser Glu Ile				
625	630	635	640	
ATT AAT GAT TTA CAA GGT AGA ATA TGT GGC CTA GAA GAA GAT TTA AAG				1968
Ile Asn Asp Leu Gln Gly Arg Ile Cys Gly Leu Glu Glu Asp Leu Lys				
645	650	655		
AAC GGC AAA ATC TTA CTA GCG AAA GTA GAA CTG GAG AAG AGA CAA CTT				2016
Asn Gly Lys Ile Leu Leu Ala Lys Val Glu Leu Glu Lys Arg Gln Leu				
660	665	670		
CAG GAG AGA TTT ACT GAT TTG GAA AAG GAA AAA AGC AAC ATG GAA ATA				2064

99																100
Gln	Glu	Arg	Phe	Thr	Asp	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Asn	Met	Glu	Ile	
675						680						685				
GAT	ATG	ACA	TAC	CAA	CTA	AAA	GTT	ATA	CAG	CAG	AGC	CTA	GAA	CAA	GAA	2112
Asp	Met	Thr	Tyr	Gln	Leu	Lys	Val	Ile	Gln	Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	
690						695						700				
GAA	GCT	GAA	CAT	AAG	GCC	ACA	AAG	GCA	CGA	CTA	GCA	GAT	AAA	AAT	AAG	2160
Glu	Ala	Glu	His	Lys	Ala	Thr	Lys	Ala	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Asn	Lys	
705						710						715				720
ATC	TAT	GAG	TCC	ATC	GAA	GAA	GCC	AAA	TCA	GAA	GCC	ATG	AAA	GAA	ATG	2208
Ile	Tyr	Glu	Ser	Ile	Glu	Glu	Ala	Lys	Ser	Glu	Ala	Met	Lys	Glu	Met	
725						730						735				
GAG	AAG	AAG	CTC	TTG	GAG	GAA	AGA	ACT	TTA	AAA	CAG	AAA	GTG	GAG	AAC	2256
Glu	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Thr	Leu	Lys	Gln	Lys	Val	Glu	Asn	
740						745						750				
CTA	TTG	CTA	GAA	GCT	GAG	AAA	AGA	TGT	TCT	CTA	TTA	GAC	TGT	GAC	CTC	2304
Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	Cys	Ser	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Leu	
755						760						765				
AAA	CAG	TCA	CAG	CAG	AAA	ATA	AAT	GAG	CTC	CTT	AAA	CAG	AAA	GAT	GTG	2352
Lys	Gln	Ser	Gln	Gln	Lys	Ile	Asn	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Lys	Asp	Val	
770						775						780				
CTA	AAT	GAG	GAT	GTT	AGA	AAC	CTG	ACA	TTA	AAA	ATA	GAG	CAA	GAA	ACT	2400
Leu	Asn	Glu	Asp	Val	Arg	Asn	Leu	Thr	Leu	Lys	Ile	Glu	Gln	Glu	Thr	
785						790						795				800
CAG	AAG	CGC	TGC	CTT	ACA	CAA	AAT	GAC	CTG	AAG	ATG	CAA	ACA	CAA	CAG	2448
Gln	Lys	Arg	Cys	Leu	Thr	Gln	Asn	Asp	Leu	Lys	Met	Gln	Thr	Gln	Gln	
805						810						815				
GTT	AAC	ACA	CTA	AAA	ATG	TCA	GAA	AAG	CAG	TTA	AAG	CAA	GAA	AAT	AAC	2496
Val	Asn	Thr	Leu	Lys	Met	Ser	Glu	Lys	Gln	Leu	Lys	Gln	Glu	Asn	Asn	
820						825						830				
CAT	CTC	ATG	GAA	ATG	AAA	ATG	AAC	TTG	GAA	AAA	CAA	AAT	GCT	GAA	CTT	2544
His	Leu	Met	Glu	Met	Lys	Met	Asn	Leu	Glu	Lys	Gln	Asn	Ala	Glu	Leu	
835						840						845				
CGA	AAA	GAA	CGT	CAG	GAT	GCA	GAT	GGG	CAA	ATG	AAA	GAG	CTC	CAG	GAT	2592
Arg	Lys	Glu	Arg	Gln	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Met	Lys	Glu	Leu	Gln	Asp	
850						855						860				
CAG	CTC	GAA	GCA	GAA	CAG	TAT	TTC	TCA	ACC	CTT	TAT	AAA	ACA	CAA	GTT	2640
Gln	Leu	Glu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Phe	Ser	Thr	Leu	Tyr	Lys	Thr	Gln	Val	
865						870						875				880
AGG	GAG	CTT	AAA	GAA	GAA	TGT	GAA	GAA	AAG	ACC	AAA	CTT	GGT	AAA	GAA	2688
Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Glu	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Glu	
885						890						895				
TTG	CAG	CAG	AAG	AAA	CAG	GAA	TTA	CAG	GAT	GAA	CGG	GAC	TCT	TTG	GCT	2736
Leu	Gln	Gln	Lys	Lys	Gln	Glu	Leu	Gln	Asp	Glu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ala	
900						905						910				
GCC	CAA	CTG	GAG	ATC	ACC	TTG	ACC	AAA	GCA	GAT	TCT	GAG	CAA	CTG	GCT	2784
Ala	Gln	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Lys	Ala	Asp	Ser	Glu	Gln	Leu	Ala	
915						920						925				
CGT	TCA	ATT	GCT	GAA	GAA	CAA	TAT	TCT	GAT	TTG	GAA	AAA	GAG	AAG	ATC	2832
Arg	Ser	Ile	Ala	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Ile	
930						935						940				

101	102
ATG AAA GAG CTG GAG ATC AAA GAG ATG ATG GCT AGA CAC AAA CAG GAA	2880
Met Lys Glu Leu Glu Ile Lys Glu Met Met Ala Arg His Lys Gln Glu	
945 950 955 960	
CTT ACG GAA AAA GAT GCT ACA ATT GCT TCT CTT GAG GAA ACT AAT AGG	2928
Leu Thr Glu Lys Asp Ala Thr Ile Ala Ser Leu Glu Glu Thr Asn Arg	
965 970 975	
ACA CTA ACT AGT GAT GTT GCC AAT CTT GCA AAT GAG AAA GAA GAA TTA	2976
Thr Leu Thr Ser Asp Val Ala Asn Leu Ala Asn Glu Lys Glu Glu Leu	
980 985 990	
AAT AAC AAA TTG AAA GAT GTT CAA GAG CAA CTG TCA AGA TTG AAA GAT	3024
Asn Asn Lys Leu Lys Asp Val Gln Glu Gln Leu Ser Arg Leu Lys Asp	
995 1000 1005	
GAA GAA ATA AGC GCA GCA GCT ATT AAA GCA CAG TTT GAG AAG CAG CTA	3072
Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gln Phe Glu Lys Gln Leu	
1010 1015 1020	
TTA ACA GAA AGA ACA CTC AAA ACT CAA GCT GTG AAT AAG TTG GCT GAG	3120
Leu Thr Glu Arg Thr Leu Lys Thr Gln Ala Val Asn Lys Leu Ala Glu	
1025 1030 1035 1040	
ATC ATG AAT CGA AAA GAA CCT GTC AAG CGT GGT AAT GAC ACA GAT GTG	3168
Ile Met Asn Arg Lys Glu Pro Val Lys Arg Gly Asn Asp Thr Asp Val	
1045 1050 1055	
CGG AGA AAA GAG AAG GAG AAT AGA AAG CTA CAT ATG GAG CTT AAA TCT	3216
Arg Arg Lys Glu Lys Glu Asn Arg Lys Leu His Met Glu Leu Lys Ser	
1060 1065 1070	
GAA CGT GAG AAA TTG ACC CAG CAG ATG ATC AAG TAT CAG AAA GAA CTG	3264
Glu Arg Glu Lys Leu Thr Gln Gln Met Ile Lys Tyr Gln Lys Glu Leu	
1075 1080 1085	
AAT GAA ATG CAG GCA CAA ATA GCT GAA GAG AGC CAG ATT CGA ATT GAA	3312
Asn Glu Met Gln Ala Gln Ile Ala Glu Glu Ser Gln Ile Arg Ile Glu	
1090 1095 1100	
CTG CAG ATG ACA TTG GAC AGT AAA GAC AGT GAC ATT GAG CAG CTG CGG	3360
Leu Gln Met Thr Leu Asp Ser Lys Asp Ser Asp Ile Glu Gln Leu Arg	
1105 1110 1115 1120	
TCA CAA CTC CAA GCC TTG CAT ATT GGT CTG GAT AGT TCC AGT ATA GGC	3408
Ser Gln Leu Gln Ala Leu His Ile Gly Leu Asp Ser Ser Ser Ile Gly	
1125 1130 1135	
AGT GGA CCA GGG GAT GCT GAG GCA GAT GAT GGG TTT CCA GAA TCA AGA	3456
Ser Gly Pro Gly Asp Ala Glu Ala Asp Asp Gly Phe Pro Glu Ser Arg	
1140 1145 1150	
TTA GAA GGA TGG CTT TCA TTG CCT GTA CGA AAC AAC ACT AAG AAA TTT	3504
Leu Glu Gly Trp Leu Ser Leu Pro Val Arg Asn Asn Thr Lys Lys Phe	
1155 1160 1165	
GGA TGG GTT AAA AAG TAT GTG ATT GTA AGC AGT AAG AAG ATT CTT TTC	3552
Gly Trp Val Lys Lys Tyr Val Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Leu Phe	
1170 1175 1180	
TAT GAC AGT GAA CAA GAT AAA GAA CAA TCC AAT CCT TAC ATG GTT TTA	3600
Tyr Asp Ser Glu Gln Asp Lys Glu Gln Ser Asn Pro Tyr Met Val Leu	
1185 1190 1195 1200	
GAT ATA GAC AAG TTA TTT CAT GTC CGA CCA GTT ACA CAG ACA GAT GTG	3648
Asp Ile Asp Lys Leu Phe His Val Asn Pro Val Thr Gln Thr Asp Val	

103												104					
1205						1210						1215					
TAT	AGA	GCA	GAT	GCT	AAA	GAA	ATT	CCA	AGG	ATA	TTC	CAG	ATT	CTG	TAT	3696	
Tyr	Arg	Ala	Asp	Ala	Lys	Glu	Ile	Pro	Arg	Ile	Phe	Gln	Ile	Leu	Tyr		
1220						1225						1230					
GCC	AAT	GAA	GGA	GAA	AGT	AAG	AAG	GAA	CAA	GAA	TTT	CCA	GTG	GAG	CCA	3744	
Ala	Asn	Glu	Gly	Glu	Ser	Lys	Lys	Glu	Gln	Glu	Phe	Pro	Val	Glu	Pro		
1235						1240						1245					
GTT	GGA	GAA	AAA	TCT	AAT	TAT	ATT	TGC	CAC	AAG	GGA	CAT	GAG	TTT	ATT	3792	
Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys	His	Lys	Gly	His	Glu	Phe	Ile		
1250						1255						1260					
CCT	ACT	CTT	TAT	CAT	TTC	CCA	ACC	AAC	TGT	GAG	GCT	TGT	ATG	AAG	CCC	3840	
Pro	Thr	Leu	Tyr	His	Phe	Pro	Thr	Asn	Cys	Glu	Ala	Cys	Met	Lys	Pro		
1265						1270						1275				1280	
CTG	TGG	CAC	ATG	TTT	AAG	CCT	CCT	CCT	GCT	TTG	GAG	TGC	CGC	CGT	TGC	3888	
Leu	Trp	His	Met	Phe	Lys	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Glu	Cys	Arg	Arg	Cys		
1285						1290						1295					
CAT	ATT	AAG	TGT	CAT	AAA	GAT	CAT	ATG	GAC	AAA	AAG	GAG	GAG	ATT	ATA	3936	
His	Ile	Lys	Cys	His	Lys	Asp	His	Met	Asp	Lys	Lys	Glu	Glu	Ile	Ile		
1300						1305						1310					
GCA	CCT	TGC	AAA	GTA	TAT	TAT	GAT	ATT	TCA	ACG	GCA	AAG	AAT	CTG	TTA	3984	
Ala	Pro	Cys	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Ser	Thr	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu		
1315						1320						1325					
TTA	CTA	GCA	AAT	TCT	ACA	GAA	GAG	CAG	CAG	AAG	TGG	GTT	AGT	CGG	TTG	4032	
Leu	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Gln	Gln	Lys	Trp	Val	Ser	Arg	Leu		
1330						1335						1340					
GTG	AAA	AAG	ATA	CCT	AAA	AAG	CCC	CCA	GCT	CCA	GAC	CCT	TTT	GCC	CGA	4080	
Val	Lys	Lys	Ile	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Pro	Asp	Pro	Phe	Ala	Arg		
1345						1350						1355				1360	
TCA	TCT	CCT	AGA	ACT	TCA	ATG	AAG	ATA	CAG	CAA	AAC	CAG	TCT	ATT	AGA	4128	
Ser	Ser	Pro	Arg	Thr	Ser	Met	Lys	Ile	Gln	Gln	Asn	Gln	Ser	Ile	Arg		
1365						1370						1375					
CGG	CCA	AGT	CGA	CAG	CTT	GCC	CCA	AAC	AAA	CCT	AGC	TAA	CTGCCTTCTA			4177	
Arg	Pro	Ser	Arg	Gln	Leu	Ala	Pro	Asn	Lys	Pro	Ser						
1380						1385											
TGAAAGCAGT CATTATTCAA GGTGATCGTA TTCTTCCAGT GAAAACAAGA CTGAAATATG																4237	
ATGACCCCAT GGTACCCGGA TCCTCGAATC TTTTGCTTTT TACCCTGGAA GAAATACTCA																4297	
TAAGCCACCT CTGTAATCGG ATCCCCGGGT ACCGAAATAC TCATAAGCCA CCTCTGTAAT																4357	
CGGATC																4363	

【図面の簡単な説明】

【図1】 活性型Rhオタンパク質に特異的に結合するタンパク質の精製の結果を示した電気泳動写真である。粗膜画分を、GST（レーン1）、GDP・GST-RhオA（レーン2）、またはGTP γ S・GST-RhオA（レーン3）を含むグルタチオン-セファロース・カラムにかけた。ウシRhオキナーゼの純度を上げるために、粗膜画分をGTP γ S・GST-RhオAを含むグルタチオン・セファロースにかけ、ウシRhオキナーゼを1%CHAPSの添加により、溶出した（レーン4）。

【図2】 Mono Q カラム・クロマトグラフィーに 50

よるウシRhオキナーゼの精製の結果を示した図および電気泳動写真である。CHAPS-溶出画分をMono Q カラムにかけ、RhオキナーゼをNaCl直線勾配で溶出した。結果は3回の独立した実験の代表例である。

【図3】ウシRhoキナーゼと活性型RhoAとの結合を示した電気泳動写真である。レーン1およびレーン3は膜抽出液を、レーン2およびレーン4はSDS-PAGEで分離した精製Rhoキナーゼをそれぞれ含むニトロセルロース膜を示す。また、レーン1およびレーン2は $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S} \cdot \text{GST-RhoA}$ を、レーン3およびレーン4は $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S} \cdot \text{GST-R}$

h o A^{A1+37}をプローブとして用いたレーンを示す。矢印は、R h o キナーゼのSDS-PAGE上の位置を示す。結果は3回の独立した実験の代表例である。

【図4】ウシR h o キナーゼの自己リン酸化能を示した電気泳動写真である。R h o キナーゼを、下記のタンパク質（各1 μM）存在下で自己リン酸化した。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-R h o A、レーン3：GTPγS・GST-R h o A、レーン4：GTPγS・GST-R h o A^{A1+37}。矢印は、R h o キナーゼのSDS-PAGE上の位置を示している。結果は3回の独立した実験の代表例である。

【図5】GST、GDP・GST-R h o A、あるいはGTPγS・GST-R h o Aのいずれかが存在する条件下での、ウシR h o キナーゼによるミエリン塩基性タンパク質、S6ペプチド、αPKC（各40 μM）のリン酸化の程度を示した図である。

【図6】ウシR h o キナーゼによるS6ペプチド（40 μM）のリン酸化を、GTPγS・GST-R h o A（1 μM）が促進することを示した図である。

【図7】ウシR h o キナーゼによるラットのマイオシン結合サブユニットのリン酸化を、GTPγS・GST-R h o Aが促進することを示した電気泳動写真である。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-R h o A、レーン3：GTPγS・GST-R h o A。矢印は、マイオシン結合サブユニットタンパク質のSDS-PAGE上の位置を示す。

【図8】ウシR h o キナーゼによるS6ペプチドのリン酸化を示した図である。黒四角形：GTPγS-R h o A（翻訳後修飾型）、白四角形：GDP-R h o A（翻訳後修飾型）、黒丸：GTPγS-GST-R h o A（非翻訳後修飾型）、白丸：GDP-GST-R h o A（非翻訳後修飾型）。

【図9】ウシR h o キナーゼの推定アミノ酸配列を示した図である。ウシ脳灰白質から精製したR h o キナーゼの部分ペプチド配列分析で決定されたアミノ酸配列は下線で示した。R h o キナーゼcDNAクローニングに用いたプローブのアミノ酸配列は二重下線で示した。

【図10】ウシR h o キナーゼとマイトニック・ディストロフィー・キナーゼのドメイン構造を比較をした図である。

【図11】ウシR h o キナーゼの発現の組織分布を示した電気泳動写真である。レーン1：GST-R h o Aアフィニティーカラムからの1%CHAPS溶出液、レーン2：大脳、レーン3：小脳、レーン4：心臓、レーン5：骨格筋、レーン6：脾臓、レーン7：肺、レーン8：肝臓、レーン9：腎臓、レーン10：膵臓。矢印は、R h o キナーゼのSDS-PAGE上の位置を示す。

【図12】インビトロ翻訳により合成したウシR h o キナーゼのコイルドコイル領域のタンパク質と活性型R

h o との結合を示した電気泳動写真である。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-R h o A、レーン3：GTPγS・GST-R h o A、レーン4：GTPγS・GST-R h o A^{A1+37}、レーン5：GDP・GST-R a c 1、レーン6：GTPγS・GST-R a c 1、レーン7：GDP・GST-H-R a s、レーン8：GTPγS・GST-H-R a s。

【図13】ウシR h o キナーゼによるニワトリのマイオシン結合サブユニットのリン酸化をGTPγS・GST-R h o Aが促進することを示した電気泳動写真である。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-R h o A、レーン3：GTPγS・GST-R h o A、レーン4：GTPγS・GST-R h o A^{A1+37}、レーン5：GDP・GST-R a c 1、レーン6：GTPγS・GST-R a c 1。レーンの上の数字は、リン酸化の程度を、GST（レーン1）の場合を1.0としたときの相対値で表している。

【図14】ウシR h o キナーゼ濃度依存的なニワトリ・マイオシン結合サブユニットのチオリン酸化とマイオシン軽鎖フォスファターゼ活性の阻害を示した図である。黒丸および白丸は、それぞれGTPγS・GST-R h o A存在下または非存在下でのマイオシン結合サブユニットへの³⁵S-チオリン酸の取り込みを示す。黒四角形および白四角形は、それぞれGTPγS・GST-R h o A存在下または非存在下、ATPγSの存在下でリン酸化したR h o キナーゼを用いた場合でのマイオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性を示す。菱形はATPγSの非存在下（即ちリン酸化していないR h o キナーゼを用いた場合）でのマイオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性を示す。

【図15】R h o AまたはR h o A^{V+114}を過剰に発現させた各NIH/3T3細胞株内でのマイオシン結合サブユニットのリン酸化の程度を示した電気泳動写真である。レーンの上の数字は、リン酸化の程度を、GST（レーン1）の場合を1.0としたときの相対値で表している。

【図16】R h o AまたはR h o A^{V+114}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞株内でのマイオシン軽鎖のリン酸化の程度を示した図である。

【図17】ウシR h o キナーゼによるマイオシン軽鎖のリン酸化を示した電気泳動写真である。単離されたマイオシン軽鎖（0.5 μgのタンパク質）を、GST（レーン1）、GDP・GST-R h o A（レーン2）、GTPγS・GST-R h o A（レーン3）、GTPγS・GST-R h o A^{A1+37}（レーン4）、GDP・GST-R a c 1（レーン5）またはGTPγS・GST-R a c 1（レーン6）の存在下において精製したウシR h o キナーゼ（タンパク質20 ng）によりリン酸化するか、またはGST-ウシR h o キナーゼ（タンパク質5 ng）（レーン7）またはCa²⁺およびカルモジュリン

の非存在下（レーン8）または存在下（レーン9）においてミオシン軽鎖キナーゼによりリン酸化した。無傷のミオシン（タンパク質5 μ g）をGTP γ S・GST-RhoAの非存在下（レーン10）または存在下（レーン11）においてリン酸化した。リン酸化されたミオシン軽鎖をSDS-PAGEにより分離し、画像解析装置により可視化した。結果は3回の独立した実験の代表的なものである。

【図18】ウシRhoキナーゼによるミオシン軽鎖のリン酸化を示した図である。種々の量のミオシン軽鎖をRhoキナーゼによりリン酸化した。「MLC」はミオシン軽鎖を、「Rho-Kinase」はRhoキナーゼを、「MLC Kinase」はミオシン軽鎖キナーゼを、それぞれ意味する（以下同じ）。左図において黒丸はGTP γ S・GST-RhoA存在下、丸印はGTP γ S・GST-RhoA非存在下におけるRhoキナーゼによるリン酸化を示す。黒三角はGST-Rhoキナーゼによるリン酸化である。右図において黒四角形および四角形はCa²⁺およびカルモジュリン存在下および非存在下におけるミオシン軽鎖キナーゼによるリン酸化を示す。

【図19】ミオシン軽鎖のリン酸化ペプチドのマッピング分析を示した電気泳動写真である。ミオシン軽鎖（0.5 μ gのタンパク質）をRhoキナーゼ（Rho-Kinase）、ミオシン軽鎖キナーゼ（MLC Kinase）またはプロテインキナーゼC（PKC）によりリン酸化した。リン酸化されたミオシン軽鎖をトリプシンで消化し、各試料をシリカゲルのプレート上にロードした。リン酸化ペプチドを電気泳動（水平方向）およびクロマトグラフィー（垂直方向）により分離し、次いで画像解析装置により可視化した。星印は原点を示す。

【図20】組換えミオシン軽鎖のリン酸化を示した電気泳動写真である。ミオシン軽鎖（MLC）、GST、GST-ミオシン軽鎖（GST-MLC）またはGST-ミオシン軽鎖^{Ala18, Ala19}（各2 μ M）を図示した様に、精製Rhoキナーゼ（20ngのタンパク質）、GST-Rhoキナーゼ（10ngのタンパク質）、またはミオシン軽鎖キナーゼ（10ngのタンパク質）によってリン酸化した。レーン1~4：ミオシン軽鎖を精製Rhoキナーゼでリン酸化した。レーン5~8：ミオシン軽鎖をGST-Rhoキナーゼによってリン酸化した。レーン9~12：ミオシン軽鎖をミオシン軽鎖キナーゼによりリン酸化した。レーン1、5および9：ミオシン軽鎖、レーン2、6、および10：GST、レーン3、7、および11：GST-ミオシン軽鎖、レーン4、8、および12：GST-ミオシン軽鎖^{Ala18, Ala19}。結果は3回の独立した実験の代表的なものである。

【図21】アクチンにより活性化されたMgATPアーゼ活性に対するウシRhoキナーゼによるミオシンのリン酸化の効果を示した図である。縦軸はミオシンヘッド

（head）のリン酸化速度である。ミオシンをGST・Rhoキナーゼ（黒四角形）、あるいはミオシン軽鎖キナーゼ（黒菱形）とともに、あるいはキナーゼ非存在下（黒丸）でインキュベートした。インキュベートの後、ATPアーゼ活性を様々な濃度のF-アクチンの存在下で測定した示した値は三回の反復実験の平均 \pm S.E.である。

【図22】Rhoタンパク質、Rhoキナーゼ（Rho-Kinase）およびミオシン軽鎖ホスファターゼによるミオシン軽鎖の調節に関するモデルを示した図である。Cat：ミオシン軽鎖ホスファターゼの触媒サブユニット、Myosin：ミオシン、MBS：ミオシン結合サブユニット。

【図23】酵母ツー・ハイブリッド・システムによるRhoタンパク質とヒトRhoキナーゼタンパク質との結合の検出を示した写真である。

【図24】Triton X-100によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管をRhoキナーゼが収縮させることを示した図である。Rhoキナーゼ（CAT）を外来的にウサギ門脈の血管平滑筋標本に導入させた。pCa 6.5（aおよびb）またはpCa < 8.0（c）にてTriton X-100によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管標本に誘導させた張力反応の代表的な記録を示している。これらの結果はいずれも3~5回の独立した実験からの代表例である。Rhoキナーゼ（CAT）の収縮効果は、Rhoキナーゼ（CAT）を洗浄することによって完全に元に戻った（b）。また、cでは、ベヒクル（vehicle）の投与用量をトータルのchamberの量（200 μ l）に対するパーセンテージで示した。

【図25】Triton X-100によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管の収縮の感受性（contractile sensitivity）がRhoキナーゼによって亢進される（potentiate）ことを示した図である。

a：7.5nM Rhoキナーゼ（CAT）（白丸）または500nM OA（黒丸）の存在下でのpCaと張力の関係。pCa 7.0以下では7.5nMのRhoキナーゼ（CAT）によって生じた張力の程度は、basalレベルであった。Steady-stateのCa²⁺と張力の関係を、Rhoキナーゼ（CAT）存在下（白丸）またはOA存在下（黒丸）あるいは非存在下（白三角・破線：対照）で、細胞質のCa²⁺濃度をcumulativeに上昇させることにより得た。Rhoキナーゼ（CAT）存在下またはOA存在下での収縮の感受性の上昇を示すために、各々の張力反応は対照のpCa 4.5での張力を1として標準化した相対値で示した。縦軸は張力の相対値を、横軸はCa²⁺濃度をpCaで、それぞれ示している。各々の値は4回の実験より得られた平均値 \pm 標準偏差である。

b：Triton X-100によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管におけるRhoキナーゼ（CAT）の用量-反応

曲線に及ぼすwortmannin (WM) (強力なミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤) の効果。実践は $pCa 6.5$ での、破線は $pCa < 8.0$ (10 mM EGTA で緩衝させた) での効果をそれぞれ示している。Steady state の張力反応を、 $10 \mu M$ の WM の存在下 (黒丸は $pCa 6.5$ 、黒三角は $pCa < 8.0$ における) または非存在下 (白丸は $pCa 6.5$ 、白三角は $pCa < 8.0$ における) で、Rhokinase (CAT) の cumulative な添加により得た。張力反応は、 $pCa 4.5$ での最大張力反応を 1 とした相対値で示した。縦軸は張力の相対値を、横軸は Rhokinase (CAT) のモル濃度 (μM) をそれぞれ示している。各々の値は 5-8 回の実験より得られた平均値 \pm 標準偏差である。ANOVA 解析を統計学的な有意差を決定するのに用いた。0.05 以下の P 値 (P value) を「有意である」とみなした (** : $p < 0.01$, N. S. ; 有意差なし)。

【図 26】Rhokinase が、 Ca^{2+} 非依存的かつ Wortmannin 非感受性な様式で、Triton X-100 によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管中のミオシン軽鎖のリン酸化を誘導することを示した電気泳動写真および図である。

a : Triton X-100 によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管中リン酸化を受けていないタイプ (白丸) のミオシン軽鎖 (MLC-P0) およびリン酸化されたミオシン軽鎖 (MLC-P1) をグリセロール-尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、抗ミオシン軽鎖抗体を用いたイムノブロットを実施した。対照 (レーン 1、 $pCa < 8.0$; レーン 2、 $pCa 6.5$) とは対照的に、 $0.255 \mu M$ の Rhokinase (CAT) は、 $10 \mu M$ の WM の非存在下 (レーン 2、5) および存在下 (レーン 3、6) において、 $pCa < 8.0$ (10 mM EGTA; レーン 1-3) および $pCa 6.5$ (レーン 4-6) において、ミオシン軽鎖のリン酸化を増加させた。これらの結果は、4 回の実験の代表例である。

b : $10 \mu M$ の WM の存在下または非存在下におけるミオシン軽鎖のリン酸化の程度 (白抜きの棒線) と収縮反応 (斜線の棒線) に及ぼす Rhokinase (CAT) の効果の定量化との比較。白抜きの棒線はトータルの MLC に対するリン酸化された MLC のパーセンテージを 4 回の実験の平均値 \pm 標準偏差で表現している。トータルの MLC リン酸化の値は Student's test によって比較した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。各々のカラムの下に数字は、a における各々のレーンと同一である。a における略語は下記の通り : G10、10 mM EGTA を含む弛緩溶液 ; 6.5、 $pCa 6.5$; WM、10 mM wortmannin、RK、 $0.255 \mu M$ Rhokinase (CAT)。

【図 27】Triton X-100 によって透過性を亢進させた血管標本における Rhokinase の欠如を示した電気泳動

写真および図である。

a : 無傷のウサギ門脈血管標本 (透過性を亢進させていないもの ; レーン 1、3、5) と Triton X-100 によって透過性を亢進させたウサギ門脈血管標本 (レーン 2、4、6) における Rhokinase の組織分布を比較するために、抗 Rhokinase 抗体 (レーン A) および抗 $20 kDa$ ミオシン軽鎖抗体を用いたイムノブロット解析を実施した。対照として、各々の抽出液の CBB 染色を示した (レーン C)。各々の抽出液を 5% SDS-PAGE によって (レーン A および B) または 15% SDS-PAGE (レーン C) によってそれぞれ解析した。

「RK」は Rhokinase、「MLC」はミオシン軽鎖を示す。これらの結果は 3 回の独立した実験の代表例である。

b : a に示された結果の濃度的 (densitometrical) な解析。無傷の組織 (レーン 3、5) および透過性を亢進させた (skinned) 組織 (レーン 4、6) における Rhokinase の免疫染色の濃度的な定量値をミオシン軽鎖のそれに対する比率として表したデータである。データは平均値 \pm 標準偏差で表現した。

【図 28】実験に用いた種々の Rhokinase の構造を模式的に示した図である。Rhokinase、Rhokinase (CAT)、Rhokinase (CAT-KD)、Rhokinase (COIL)、Rhokinase (RB) および Rhokinase (PH) の模式図を示す。

【図 29】オーバーレイ・アッセイによる Rhokinase タンパク質と Rhokinase との結合を示した電気泳動写真である。SDS-PAGE にかけて後、ニトロセルロース膜に移した精製 Rhokinase (レーン 1、3)、Rhokinase (RB) (レーン 2、4) を $[^{35}S]$ GTP $\gamma S \cdot GST-Rhokinase A$ (レーン 1、2) あるいは $[^{35}S]$ GTP $\gamma S \cdot GST-Rhokinase A^{1-37}$ (レーン 3、4) をプローブにしてオーバーレイアッセイした結果を示す。結果は、3 回の独立した実験の代表例を示す。

【図 30】ミオシン軽鎖を GTP $\gamma S \cdot GST-Rhokinase A$ ($1.5 \mu M$) の存在下または非存在下において天然 Rhokinase または Rhokinase (CAT) でリン酸化した結果を示した図である。データは 3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM である。

【図 31】ドミナントネガティブ変異体およびスタウロsporin のミオシン軽鎖のリン酸化に与える影響を示した図である。

a : ミオシン軽鎖を種々の濃度の Rhokinase (RB) とともに、Rhokinase (CAT) (□) により、または GTP $\gamma S \cdot GST-Rhokinase A$ の存在下において天然 Rhokinase により (○) リン酸化した。

b : ミオシン軽鎖を種々の濃度のスタウロsporin とともに、Rhokinase (CAT) により (□)、または GTP $\gamma S \cdot GST-Rhokinase A$ の存在下において天然 R

111

h oキナーゼにより (○) リン酸化した。データは3回の独立した実験の平均 \pm s SEMである。

【図32】R h oキナーゼによるアクチンの再構成を示す写真(生物の形態の写真)である。ベヒクル (vehicle) で刺激 (a)、マイクロインジェクションなしでL P A (200 ng) で15分間刺激 (b)、C 3酵素 (80 μ g/ml) をマイクロインジェクションしてL P A で刺激 (c)、スタウロスポリン (100 nM) で処理15分後にL P A で処理 (d)、R h oキナーゼ (C A T) (0.5 mg/ml) を単独でマイクロインジェクション (e)、R h oキナーゼ (C A T) とC 3をマイクロインジェクション (f)、スタウロスポリンで処理15分後にR h oキナーゼ (C A T) をマイクロインジェクション (g) したコンフルエントな血清飢餓させたS w i s s 3 T 3細胞で形成されたアクチンフィラメントを示す。

【図33】R h oキナーゼによるフォーカル接着 (Focal adhesion) の形成を示す写真(生物の形態の写真)である。ビンキュリンの局在を示している。写真h以外の実験条件は図32と同様である。写真hは、R h oキナーゼ (C A T) をマイクロインジェクションしたS w i s s 3 T 3細胞でのアクチンフィラメントとビンキュリンの局在を示している。やじり印はマイクロインジェクションした場所、棒線は20 μ mを示している。

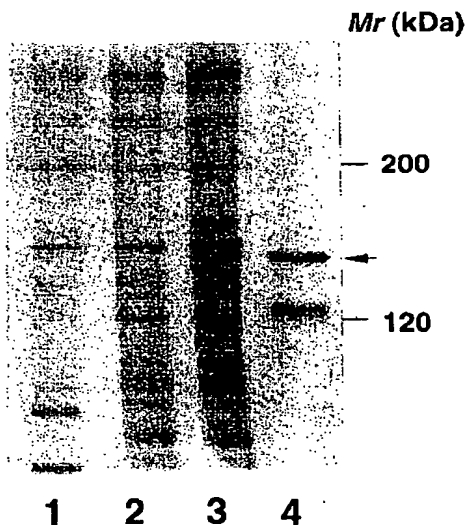
【図34】L P Aにより誘導されるアクチンフィラメントの再構成とフォーカル接着 (Focal adhesion) の形成に及ぼす種々のR h oキナーゼの影響を示す写真(生物*

112

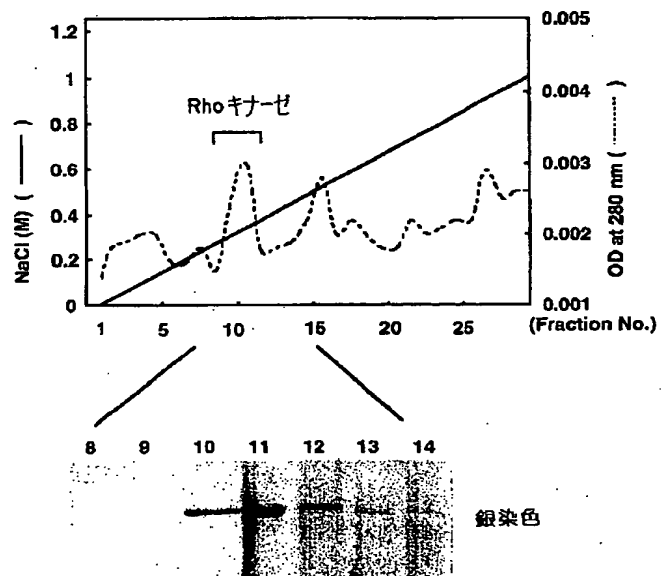
*の形態の写真) である。コンフルエントな血清飢餓させたS w i s s 3 T 3細胞に、2 mg/mlのR h oキナーゼ (C A T-KD) (A、E)、5 mg/mlのR h oキナーゼ (C O I L) (B、F)、5 mg/mlのR h oキナーゼ (R B) (C、G)、5 mg/mlのR h oキナーゼ (P H) (D、H) をマイクロインジェクションした後200 ng/mlのL P Aで刺激した。アクチンフィラメントとビンキュリンの局在を示している。やじり印はマイクロインジェクションした場所、棒線は20 μ mを示している。

【図35】M D C K細胞におけるアクチンの再構成を示した写真(生物の形態の写真)である。p E F-B O S-H A-R h o A^{V¹¹⁴} (0.1 mg/ml) + p E F-B O S-m y c (1 mg/ml) (A)、p E F-B O S-m y c-R h oキナーゼ (C A T) (0.1 mg/ml) + p E F-B O S-m y c (1 mg/ml) (B)、p E F-B O S-H A-R h o A^{V¹¹⁴} + p E F-B O S-m y c-R h oキナーゼ (C A T-KD) (1 mg/ml) (C)、p E F-B O S-H A-R h o A^{V¹¹⁴} + p E F-B O S-m y c-R h oキナーゼ (R B) (1 mg/ml) (D)、p E F-B O S-H A-R h o A^{V¹¹⁴} + p E F-B O S-m y c-R h oキナーゼ (P H) (1 mg/ml) (E) をマイクロインジェクションしたM D C K細胞でのアクチンフィラメントを示している。やじり印はマイクロインジェクションした場所、棒線は20 μ mを示している。

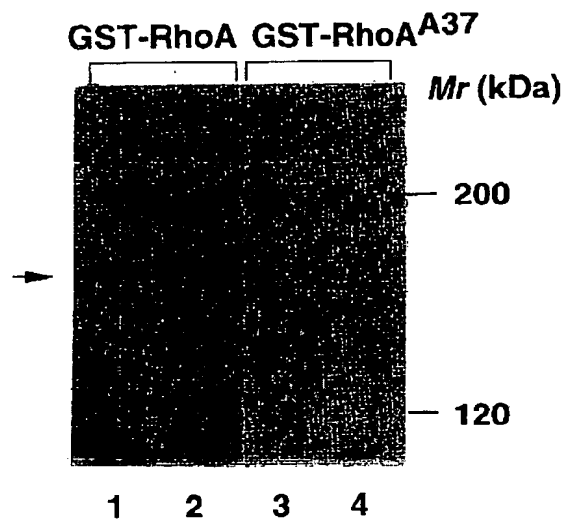
【図1】



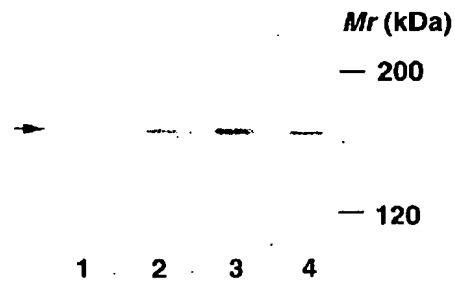
【図2】



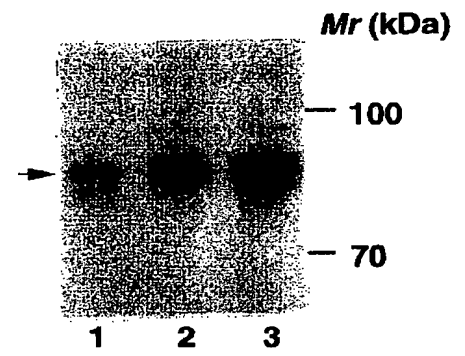
【図3】



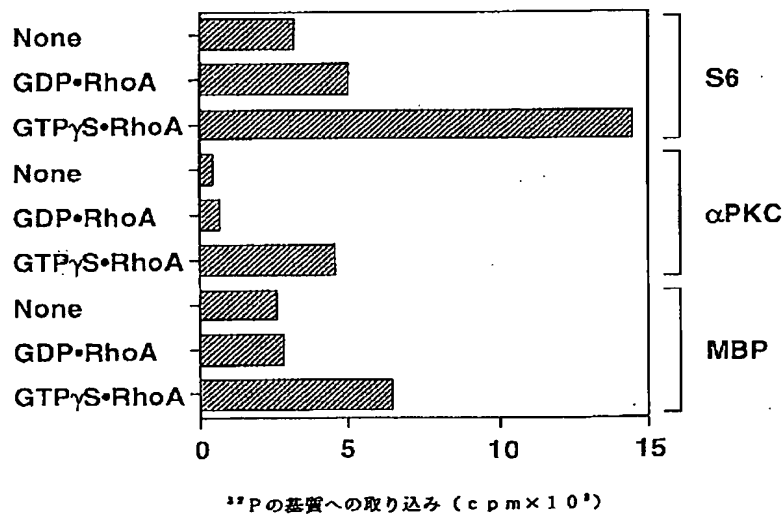
【図4】



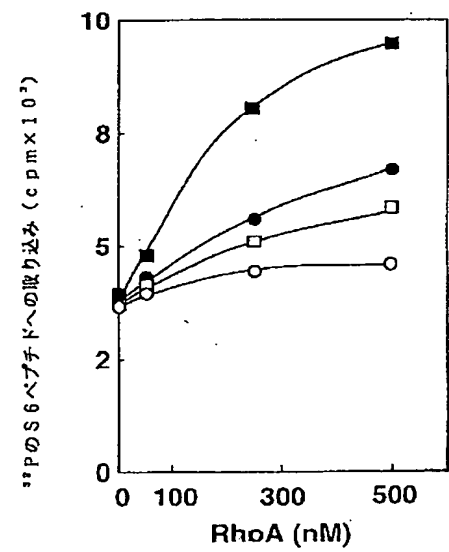
【図7】



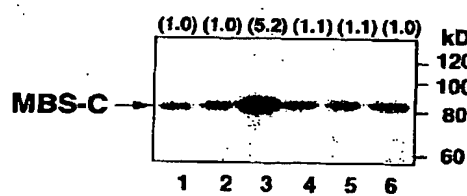
【図5】



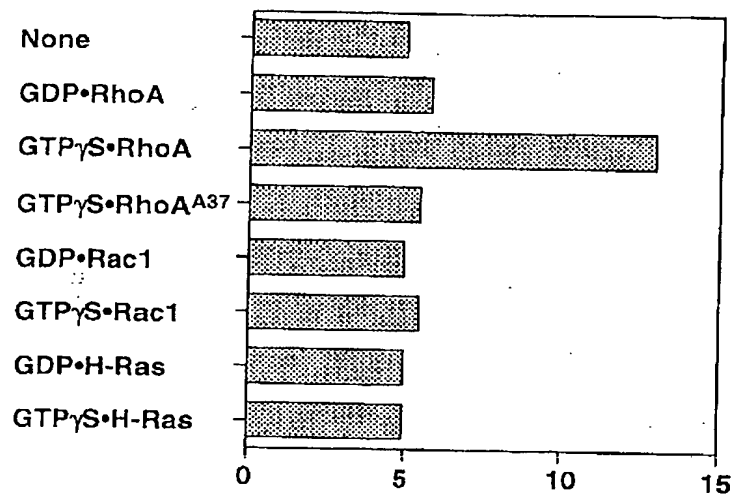
【図8】



【図13】

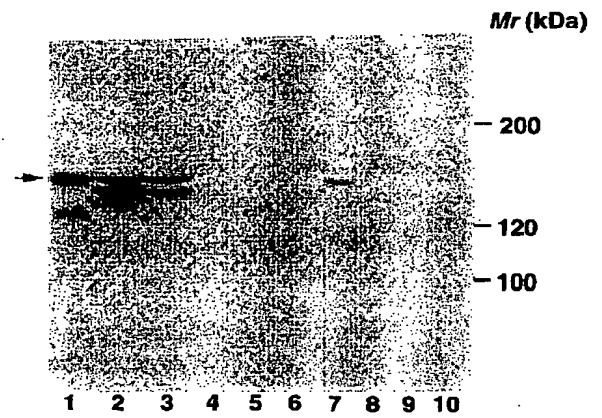


【図6】

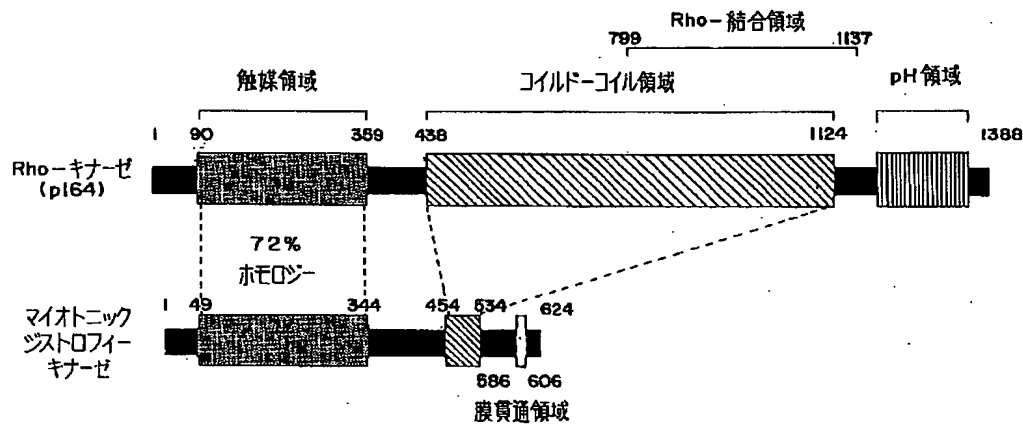


^{32}P のS6ペプチドへの取り込み ($\text{cpm} \times 10^4$)

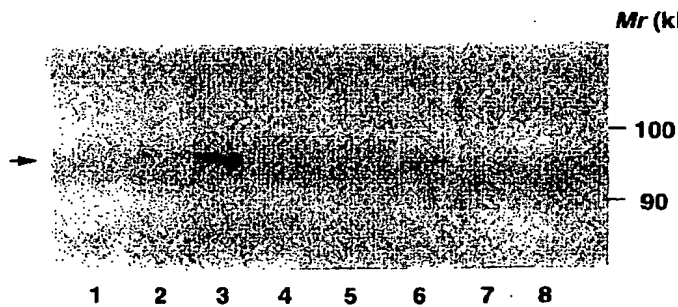
【図11】



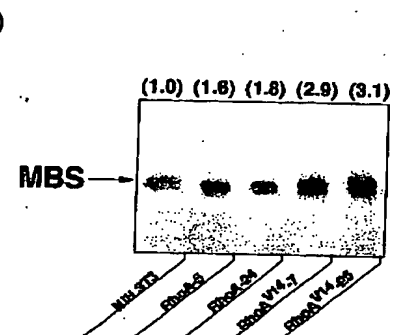
【図10】



【図12】



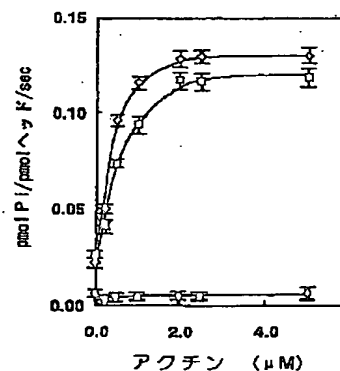
【図15】



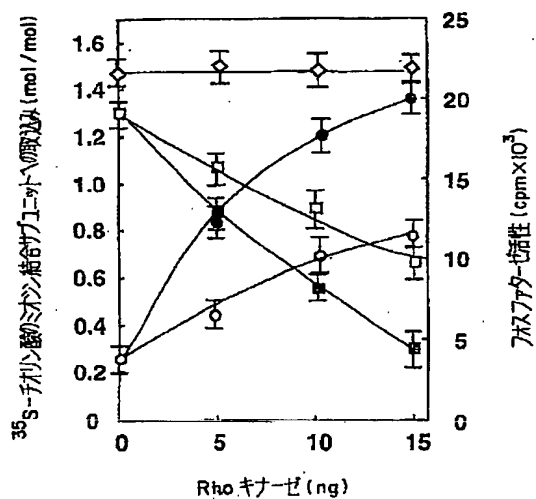
【図9】

10	20	30	40	50	60
MSRPPTGRM	PGAPEAVSGD	GAGASRQKRL	EALIRDPSP	INVESLLDGL	NPLVLDLDFP
70	80	90	100	110	120
ALRKNKNIDN	FLNRYEKIVK	KIRGLQMKAE	DYDVVKVIGR	GAFGEVQLVR	HKASQKVYAM
130	140	150	160	170	180
KLLSKFEMIK	RSDSAFFWEE	ROIMAFANSP	WVQLFCAFO	DDKYLVMVME	YMPGGDLVNL
190	200	210	220	230	240
MSNYDVPEKW	AKFYTAEVVL	ALDAIHSNGL	IHRDVKPDNM	LLDKHGHLKL	ADFGTCMKMD
250	260	270	280	290	300
ETGMVHCITA	VGTFDYISPE	VLKSQGGDGY	YGRECDWWSV	GVFLFEMLVG	DTPFYADSLV
310	320	330	340	350	360
GTYSKIMDHK	NSLCFPEDAE	ISKHAKNLIC	AFLTDRVRL	GRNGVEEIKQ	HPFFKNDQWN
370	380	390	400	410	420
WDNIRETAAP	VVPELSSDID	SSNFDDIEDD	KGDVETFPPI	KAFVGNQLPF	IGFTYYRENL
430	440	450	460	470	480
LLSDSPSCKE	NDSIQSRKNE	ESQEIQKLY	TLEEHLSTEI	QAKEELEQKC	KSVNIRLEKV
490	500	510	520	530	540
AKELEEEITL	RKNVESTLRQ	LEREKALIQH	KNAEYQRKAD	HEADKKRNLE	NDVNSLKDQL
550	560	570	580	590	600
EDLKKRNQNS	QISTEKNVQL	QRQLDETNAL	LRTESDTAAR	LRKTQAESSK	QIQQLESNNR
610	620	630	640	650	660
DLQDKNCILLE	TAKLKLEKEF	INLQSVLESE	RRDRTHGSET	INDLQGRISG	LEEDVKNGKI
670	680	690	700	710	720
LLAKVELEKR	QLQERFTDLE	KEKNMEIDM	TYQLKVIQGS	LEQEETEHA	TKARLADKNK
730	740	750	760	770	780
IYESIEEAKS	EAMGEMEKKL	SEERTLKQKV	ENLLLEAEKR	CSILDCDLKQ	SQQKINELLK
790	800	810	820	830	840
QKQVLNEIDVR	NLTLEKIQET	QKRCLTQNDL	KMQTQQVNTL	KMSEKQLKQE	NNHLLMKMS
850	860	870	880	890	900
LEKQNAELRK	ERQDADGQMK	ELQDQLEAEQ	YFSTLYKTQV	RELKEECCEK	TKLCKELQOK
910	920	930	940	950	960
KQELQDERDS	LAAQLEITLT	KADSEQLARS	IAEEQYSOLE	KEKIMKELEI	KEMMARHKQE
970	980	990	1000	1010	1020
LTEKDATTAS	LEETNRITLS	DVANLANEKE	ELMNKLKEAQ	EQLSRLKDEE	ISAAAIAQAF
1030	1040	1050	1060	1070	1080
EKQLLTERTL	KTQAVNKLAE	IMNRKEPVKR	GNDTDVRRKE	KENRKLHMEI	KSEREKLTQQ
1090	1100	1110	1120	1130	1140
MIKYQKELNE	MQAQIAEESQ	IRIELQMTLD	SKDSIEQLR	SQLQALHIGL	DSSSIGSGPG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
DTEADDGFPE	SRLEGWLSLP	VRNNTKFGW	VKKYVTVSSK	KILFYDSEQD	KEQSNPVMVL
1210	1220	1230	1240	1250	1260
DIDKLFHVRP	VTQTDVYRAD	AKETPRIFQI	LYANEGESKK	EQEFPVPEVG	EKSNIYCHKG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
HEFIPTLYHF	PTNCEACMKP	LWHMFKPPPA	LECRCHIKK	HGDHMDKKEE	IIAPCKVYYD
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ISSAKNLLL	ANSTEEQKW	VSRLVKKIPK	KPPAPDPFAR	SSPRTSMXIQ	QNSIRRPSPR
1390	1400	1410	1420	1430	1440
QLAPNKPS					

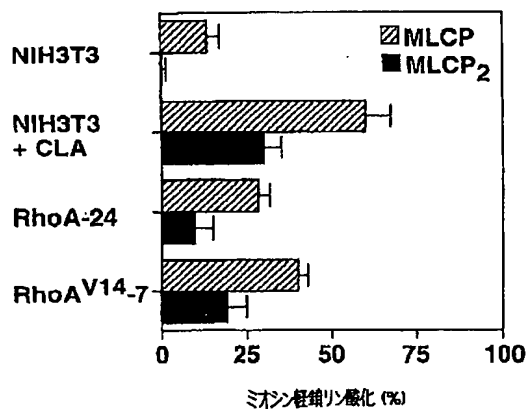
【図21】



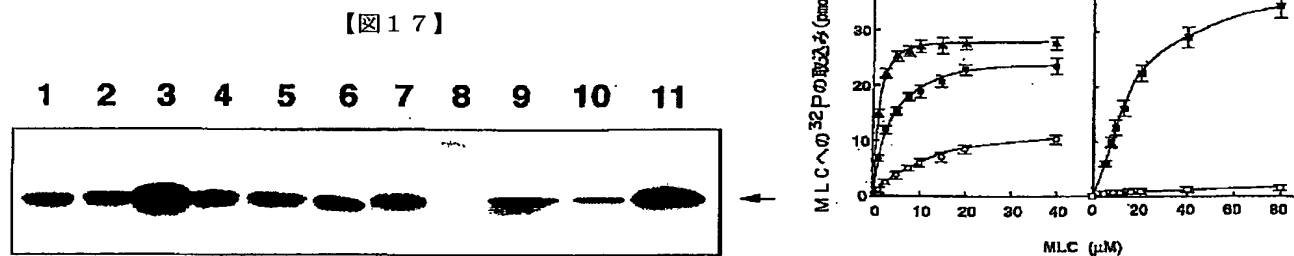
【図14】



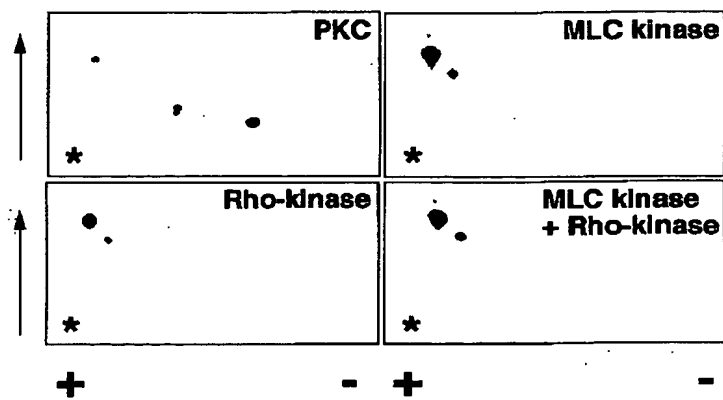
【図16】



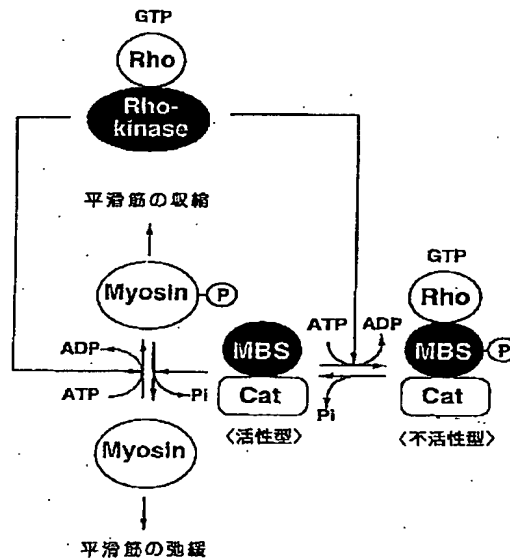
【図18】



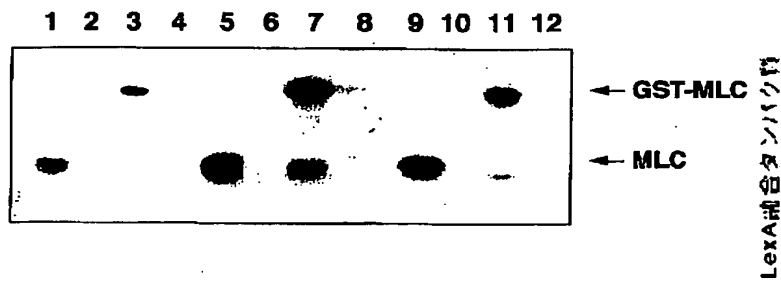
【図19】



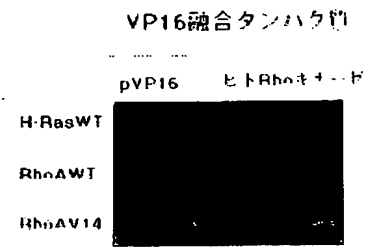
【図22】



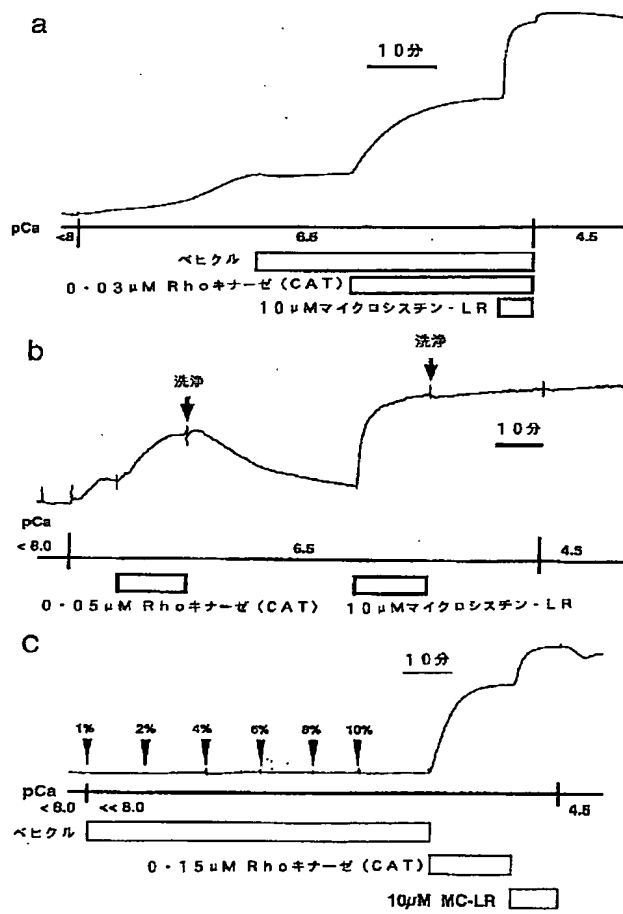
【図20】



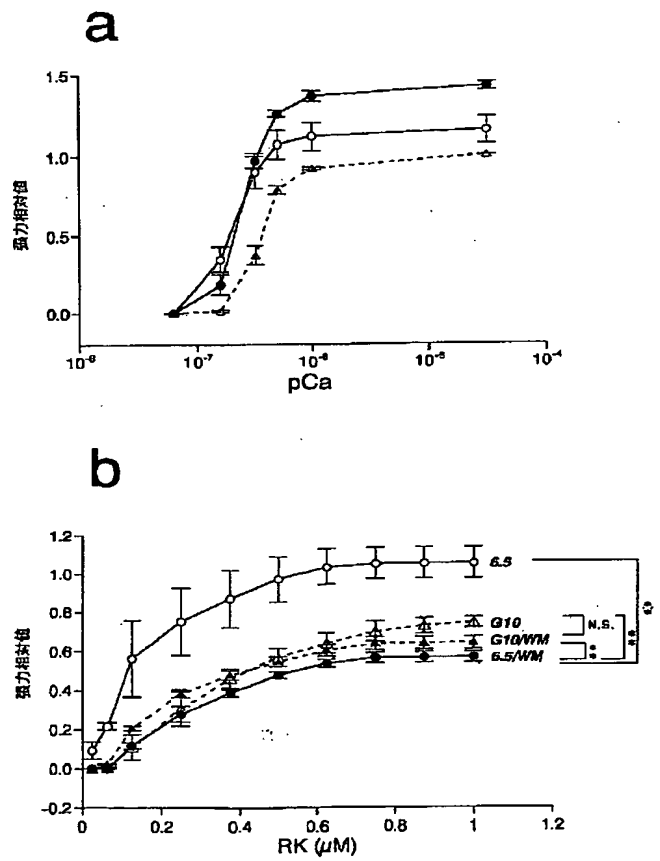
【図23】



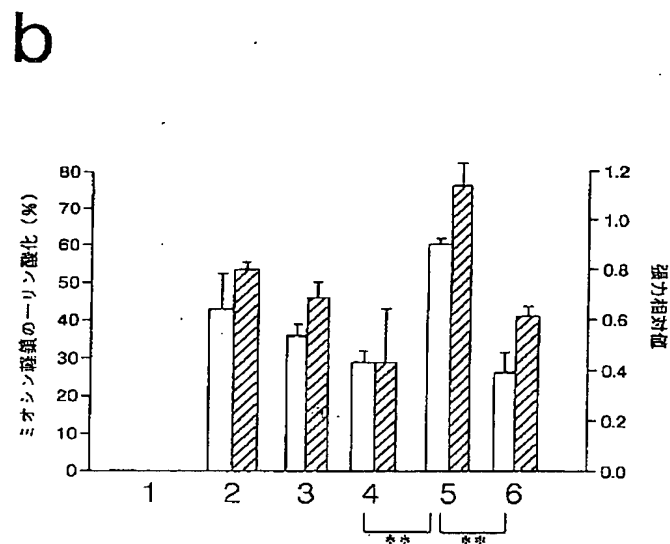
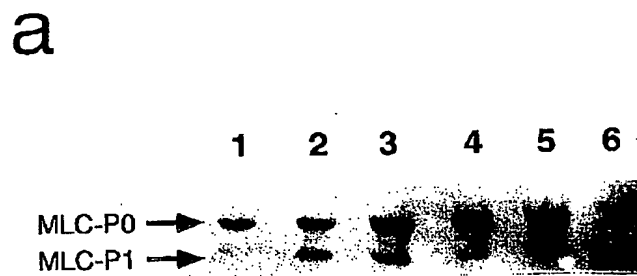
【図24】



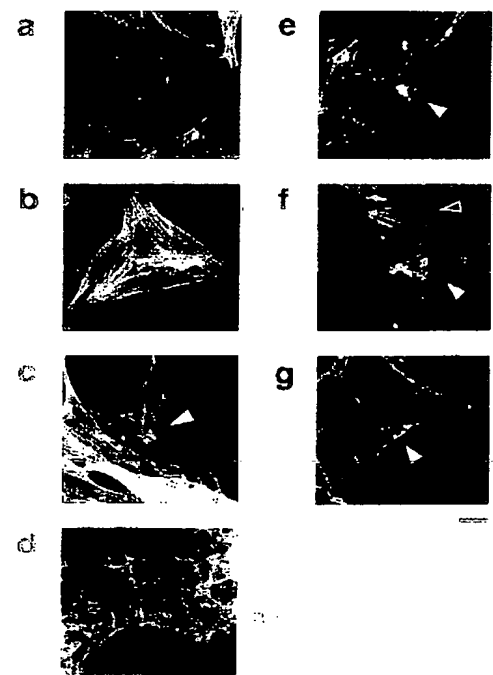
【図25】



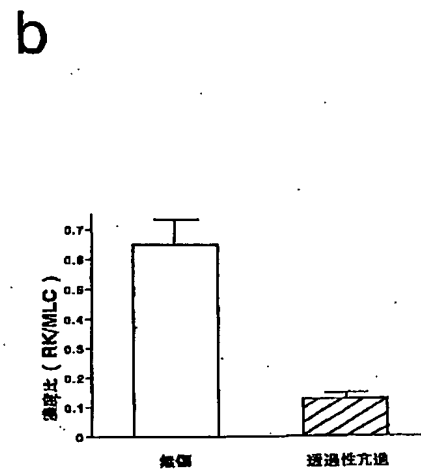
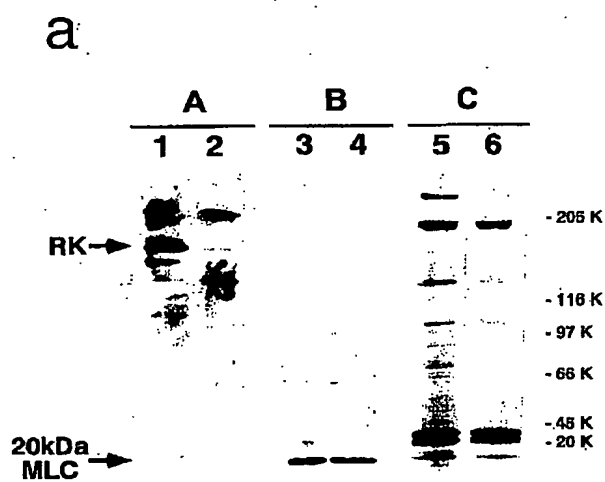
【図26】



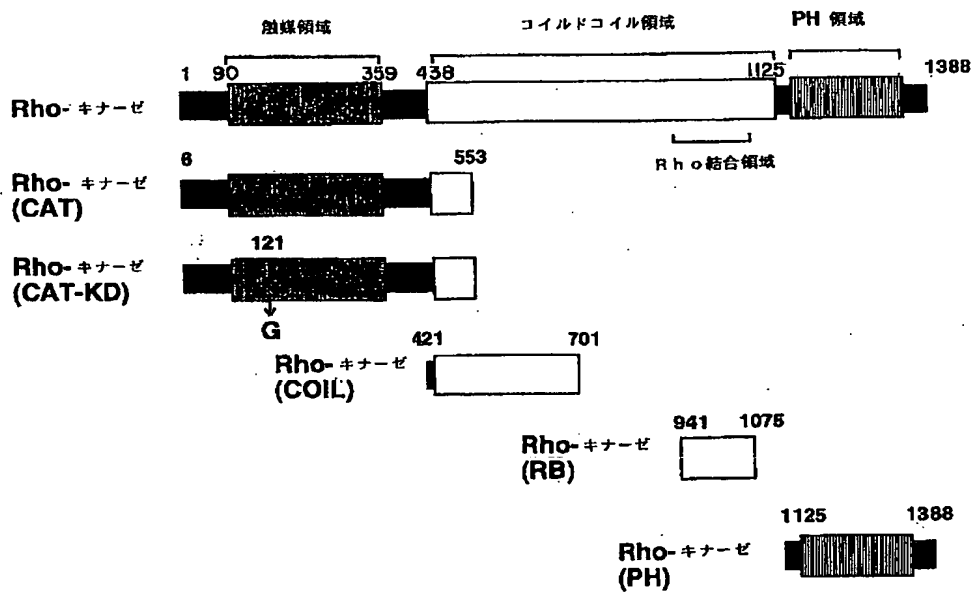
【図32】



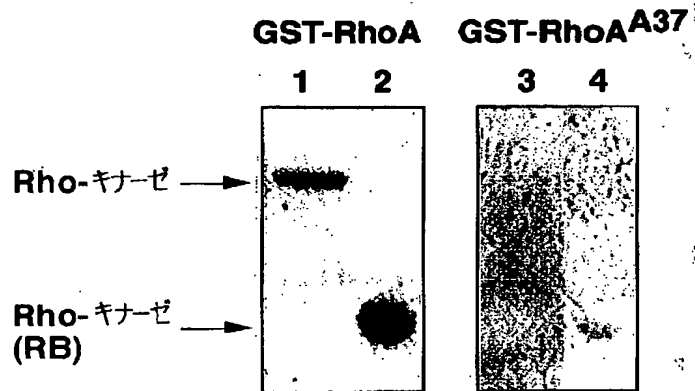
【図27】



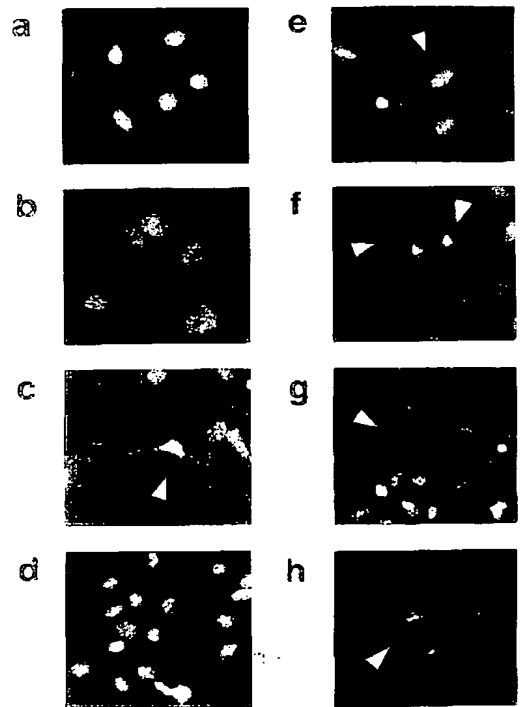
【図28】



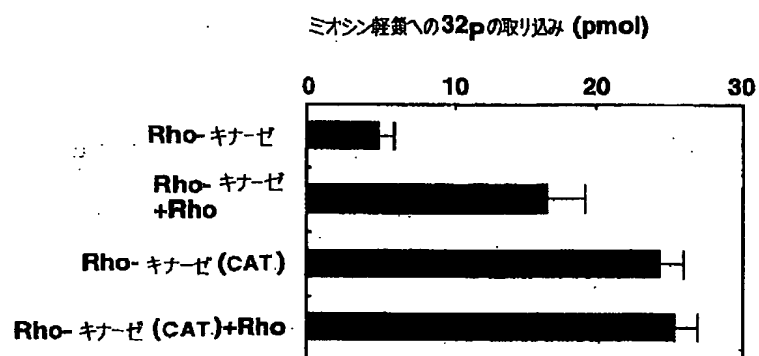
【図29】



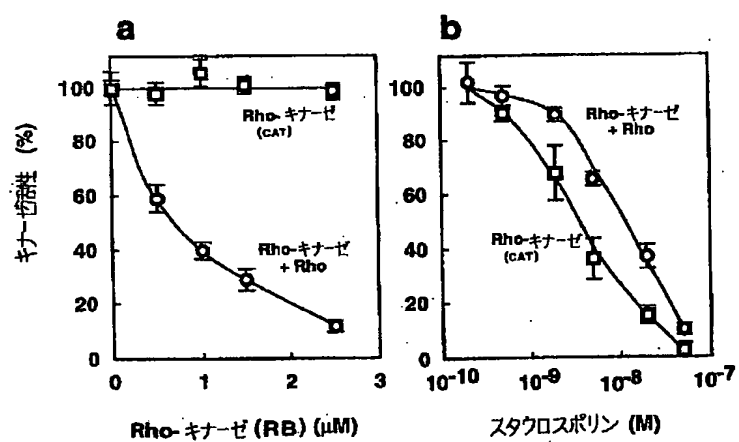
【図33】



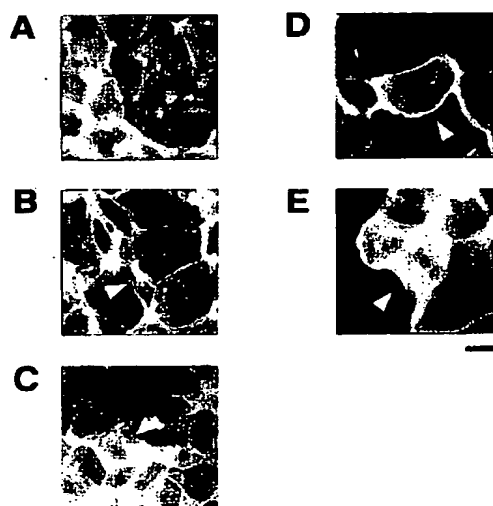
【図30】



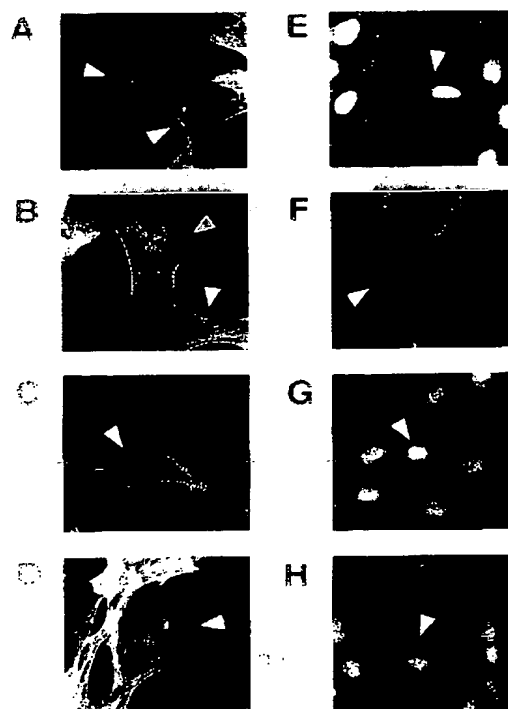
【図31】



【図35】



【図34】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号
A 6 1 K 45/00	A B E
48/00	A B R
C 1 2 N 1/19	
1/21	
5/10	
9/12	
C 1 2 Q 1/48	
G 0 1 N 33/50	
33/53	
33/566	
//(C 1 2 N 9/12	
C 1 2 R 1:91)	

F I	
C 1 2 N 9/12	
C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/50	T
33/53	D
33/566	
A 6 1 K 37/52	A B U
	A B X
	A C B
	A D U
C 1 2 N 5/00	B

(31) 優先権主張番号 特願平8-213243
 (32) 優先日 平 8 (1996) 7 月 24 日
 (33) 優先権主張国 日本 (J P)
 (31) 優先権主張番号 特願平8-241061
 (32) 優先日 平 8 (1996) 8 月 23 日
 (33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 7 年 7 月 25 日
 社団法人日本生化学会発行の「生化学第67巻第 7 号」に
 発表

(72) 発明者 高 橋 信 明
 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 麒麟
 醸麦酒株式会社基盤技術研究所内
 (72) 発明者 小 林 誠
 山口県宇部市北琴芝 1-2-10-106